



Institut für Biotechnologie

Untersuchungen zum Export verzweigtkettiger Aminosäuren in *Corynebacterium glutamicum*

Nicole Kennerknecht

Untersuchungen zum Export verzweigtkettiger Aminosäuren in *Corynebacterium glutamicum*

Nicole Kennerknecht

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4054

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4054

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Analysis of Export of Branched-Chain Amino Acids in *Corynebacterium glutamicum*

The essential amino acid L-isoleucine plays an important role in the physiology of humans and animals. In the few last years there have been many attempts to overproduce L-isoleucine with the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Physiological experiments revealed the existence of an active export carrier for this amino acid. Therefore, the identification and isolation of the coding gene and subsequent functional analysis was the aim of this work.

In order to clone the exporter gene from *C. glutamicum* a transposon mutant was isolated which was unable to excrete L-isoleucine. Cloning and sequencing of the insertion site of the transposon revealed a gene cluster consisting of three genes. Two of these genes code for highly hydrophobic proteins with a molecular weight of 27.3 KDa and 11.5 KDa, respectively. The presence of seven putative transmembrane helices in the larger and four in the smaller protein suggests that both are integral membrane proteins. Adjacent, but transcribed divergently to the two genes, a possible regulatory gene (*lrp*) is located. Functional analysis with defined mutants was performed determining the active export rates. The export rate for L-isoleucine in a strain deleted of both genes was not detectable. Overexpression of both genes resulted in an increased export rate of $7.8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ dw}$ compared to the wild type with $4.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ dw}$. Both genes are required to mediate isoleucine export. The gene of the possible regulator Lrp is essential for the export suggesting an activating role for the expression of the carrier genes. The branched-chain amino acids L-leucine and L-valine are also excreted by this system. According to the function of the proteins as export carriers for branched-chain amino acids, they were named BrnFE. Database analyses resulted in the identification of more than 25 sequences with identities to BrnF and BrnE. In all cases the genomic organisation was identical to *brnF* located upstream of *brnE*. The homologous proteins are now summarized as the LIV-E family of transporters. Interestingly, *C. glutamicum* possesses a second paralogous BrnFE system of presently unknown function.

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	7
1 Bakterienstämme und Plasmide	7
2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	11
2.1 Nährmedien	11
2.2 Zusätze zu den Medien	11
2.3 Kultivierungsbedingungen	12
2.4 Stammhaltung	13
3 Molekulargenetische Methoden	13
3.1 DNA-Isolierung	14
3.2 Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA	15
3.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion	16
3.4 Transformationstechniken	17
3.5 Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>C. glutamicum</i> durch Konjugation	18
3.6 Transposonmutagenese	19
3.7 Konstruktion und Nachweis von Integrations- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	20
3.8 Herstellung von Stämmen zur Produktion von L-Isoleucin mit <i>C. glutamicum</i>	21
3.9 Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen	23
4 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	24
5 Bestimmung von Exportraten	24
5.1 Exportratenassay	25
5.2 Silikonölzentrifugation	26
5.3 Berechnungen zur Exportrate für L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin	27
6 Biochemische Methoden	28
6.1 Native Proteinaufreinigung von 6 x Histidin-Fusionsproteinen mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie	28
6.2 Proteinbestimmung	30
6.3 Protein- und Western-Blot-Analyse	30
6.4 Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS Analyse	31
6.5 Bestimmung von β -Galaktosidase Aktivität	32
III. ERGEBNISSE	33
1 Isolierung und Charakterisierung Peptid-sensitiver Transposonmutanten	33
1.1 Screeningsystem auf Peptidsensitivität	33
1.2 Transposonmutagenese und Isolierung Peptid-sensitiver Mutanten	34
1.3 Identifizierung des Insertionsortes des Transposons Peptid-sensitiver Mutanten	36
1.4 Untersuchungen der Transposonmutanten	38
2 Untersuchungen zum Export verzweigtkettiger Aminosäuren	43
2.1 Isolierung des <i>brnFEIrp</i> Genclusters aus <i>C. glutamicum</i> 13032 und Sequenzvergleich	43

2.2	Stammkonstruktionen und Untersuchungen zur Funktion des <i>brnFE</i> lrp Genclusters in <i>C. glutamicum</i>	45
2.3	Quantifizierung von Isoleucin-Exportraten in <i>C. glutamicum</i> bei unterschiedlicher Expression von <i>brnFE</i>	49
2.4	Physiologische Untersuchungen zum heterodimeren Aufbau des Exporters BrnFE	54
2.5	Untersuchungen zur Spezifität des Exportes	56
2.6	Bedeutung des putativen Regulators Lrp für den Isoleucinexport	59
3	Identifizierung der LIV-E Familie der Transporter	60
3.1	Phylogenetische Analysen	60
3.2	Untersuchungen zum paralogen <i>brnFE</i> -System in <i>C. glutamicum</i>	67
3.2.1	Sequenzanalyse	67
3.2.2	Konstruktion und Charakterisierung einer <i>brnF</i> -2-Inaktivierungsmutante	70
3.2.3	Konstruktion eines <i>brnF</i> -2- <i>lacZ</i> -Fusionsstammes und Untersuchungen zur Expression	73
3.3	Untersuchungen zur Struktur des Isoleucinexporters	77
4	Einfluss des Transportes verzweigtkettiger Aminosäuren auf die Isoleucinbildung mit <i>C. glutamicum</i>	84
4.1	Einfluss des Exporters BrnFE auf die Isoleucinbildung in MH20-22BΔ <i>lysA</i>	86
4.2	Einfluss des Aufnahmesystems BrnQ auf die Isoleucinbildung	89
IV.	DISKUSSION	92
V.	ZUSAMMENFASSUNG	103
V.	LITERATURVERZEICHNIS	104
VI.	ANHANG	117
1	Oligonukleotidsequenzen	117
2	Plasmidkarten	120
3	Deletionsnachweise	126
4	Datenblätter zur Produktbildung	128

ABBKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bis-Tris	(Bis-2-(Hydroxyethyl)-Imino-Tris-(Hydroxymethyl)-Methan-HCl)
bp	Basenpaare
Brij58	Polyoxyethylen-20-hexadecylether
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Cm	Chloramphenicol
C-/N-Terminus	Carboxy-/Amino-Terminus
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fbr	<i>Feedback resistant</i>
h	Stunde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Kn	Kanamycin
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
MES	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
μ F	Mikrofarad
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation -Time of Flight - Mass Spectrometer</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>

min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriacetat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ori	<i>origin of replication</i>
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfat</i>
t/a	Tonnen pro Jahr
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
mU	Enzymeinheiten (Units in $\mu\text{mol min}^{-1}$)
rpm	<i>Rounds per minute</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XGal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosid

I. EINLEITUNG

Die mikrobiellen Transporter dienen dem Austausch von Substanzen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung. Dabei erfolgt der Transport meistens Energie-gekoppelt. Nicht Energie-abhängig ist der Transport durch Kanäle und Poren. Diese erleichtern die Diffusion entsprechend dem Konzentrationsgradienten der zu translozierenden Substanzen (Saier, 2000a). Bisher sind mehr als 250 Transporterfamilien bekannt, die nach dem sogenannten TC-System eingeteilt werden (Saier, 2000a). Die Einteilung unterscheidet unter anderem nach der Art der Energetisierung. So wird bei primären Transportern die für den Transportprozess benötigte Energie durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Bei sekundär aktiven Transporten beziehen diese die Energie aus dem elektrochemischen Potential der Zellmembran, und im speziellen Falle der Gruppentranslokation wird das Substrat während des Transportprozesses modifiziert. Diese Einteilung nach der Art der Energetisierung spiegelt sich auch in verwandten Strukturen der jeweiligen Transporter wieder (Henderson, 1998). All diese Untersuchungen und Klassifizierungen sind zum größten Teil bei Aufnahmesystemen durchgeführt.

Während die Aufnahme von Substanzen in vielerlei Hinsicht sehr gut untersucht ist, ist dies für den Export weit weniger der Fall. In einigen Fällen ist aber bekannt, dass dem Export eine ebenso essentielle Funktion zukommen kann wie dem Import. So müssen beispielsweise die Abfallprodukte, die bei Gärprozessen entstehen, ausgeschieden werden. Es ist bekannt, dass bei *Lactococcus lactis* das bei der Milchsäuregärung entstehende Lactat aktiv ausgeschieden wird (Konings *et al.*, 1992). Durch die große Gruppe der „multi drug transporter“ wird den Organismen das Wachstum in einer sonst toxischen Umgebung ermöglicht, da die aus der Umgebung in die Zelle gelangten toxische Substanzen aktiv exportiert werden müssen (Putmann *et al.*, 2000). Solche Exporter verleihen vielen humanpathogenen Bakterien Resistenz gegenüber Antibiotika. So erfolgt der Export toxischer β -Lactamantibiotika durch das kürzlich in seiner Struktur aufgeklärte AcrAB-TolC System (Murakami *et al.*, 2002). Weit weniger verstanden ist hingegen der Export von für die Zelle eigentlich lebensnotwendigen Substanzen, wie Zuckern oder Aminosäuren. In jüngster Zeit sind aber einige Exportsysteme identifiziert worden, die den Export solcher Primärmetabolite katalysieren.

So wurde festgestellt, dass die Genprodukte von *setA* und *setB* in *Escherichia coli* den Export von Lactose und Glucose katalysieren (Liu *et al.*, 1999a). Ein entfernt verwandtes paraloges Protein von *E. coli*, das mit YdeE bezeichnet wurde, katalysiert den Export von Arabinose (Bost *et al.*, 1999) und ein weiteres Orthologes, das Genprodukt von *setB* aus *Erwinia chrysanthemi*, exportiert ebenfalls wahrscheinlich Lactose (Condemie, 2000). Die physiologische Funktion von diesen neuartigen Exportern ist bisher noch nicht verstanden. Beispielsweise zeigt eine *setABC* Dreifachmutante von *E. coli* keinen Phänotyp unter den angewandten Versuchsbedingungen (Liu *et al.*, 1999a). Da aber die Überexpression von *setA* eine Resistenz gegenüber ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-thiogalactosid) bedingt, ist dessen Genprodukt möglicherweise an der Entgiftung von nicht verstoffwechselbaren Zuckern beteiligt (Liu *et al.*, 1999b).

Von zwei Transportern in *E. coli* ist bekannt, dass sie den Export der Aminosäuren L-Homoserin und L-Threonin katalysieren. So resultiert bei Überexpression von *rhtB* und *rhtC* eine externe Akkumulation dieser Metabolite (Zakataeva *et al.*, 1999, Kruse *et al.*, 2002). Bei Überexpression von *ydeD* hingegen, wird eine externe Anhäufung von Metaboliten des Cysteinestoffwechsels beobachtet (Dassler *et al.*, 2000). Während die primäre Funktion dieser möglicherweise am Aminosäurehaushalt beteiligten Exporter in *E. coli* noch unbekannt ist, konnte in *Corynebacterium glutamicum* gezeigt werden, dass dort der Exporter LysE spezifisch dem Export basischer Aminosäuren dient. Die Inaktivierung des *lysE*-Gens resultiert in einem Wachstumsarrest mit hohen internen Lysin- bzw. Argininkonzentrationen bei Wachstum in Komplexmedium oder in Anwesenheit von Peptiden, die diese basischen Aminosäuren enthalten. Da es vorstellbar ist, dass *C. glutamicum* in seinem natürlichen Habitat Peptide als C- und N-Quelle verwendet (Erdmann *et al.*, 1993), die Aminosäure Lysin aber nicht metabolisiert werden kann, muss zumindest L-Lysin ausgeschieden werden. Dadurch wird die Zelle vor einer toxischen intrazellulären Akkumulation von L-Lysin oder auch L-Arginin bewahrt (Bellmann *et al.*, 2001; Vrljic *et al.*, 1996). Die Expression des *lysE*-Gens wird streng durch den Regulator LysG zusammen mit erhöhter intrazellulärer Konzentration von L-Lysin oder L-Arginin kontrolliert (Bellmann *et al.*, 2001). Untersuchungen zur Topologie ergaben eine ungewöhnliche Struktur von LysE mit nur fünf Transmembranen und einer der periplasmatischen Seite der

Membran anliegende hydrophoben α -Helix (Bellmann *et al.*, 2001). Da LysE-Homologe in einer großen Anzahl von Bakterien vorhanden sind, kann erwartet werden, dass diese Art der intrazellulären Aminosäure-Kontrolle in einer Vielzahl von Organismen vorhanden ist. In der Tat wurde Aminosäureexport bei *Lactococcus lactis* in Milch beobachtet, obwohl die dafür verantwortlichen Exporter noch nicht identifiziert sind (Juillard *et al.*, 1995). Es ist also davon auszugehen, dass der intrazelluläre Aminosäurepool zusätzlich zur Regulation in der Synthese zumindest in einigen Fällen auch durch den Export reguliert wird. Somit stellt in Bakterien der gezielte Aminosäureexport neben der Aminosäuresynthese einen zweiten Mechanismus zur Kontrolle der intrazellulären Aminosäurekonzentration dar. Auch für den Export von L-Threonin wurde in *C. glutamicum* ein aktiver Transportmechanismus festgestellt (Palmieri *et al.*, 1996) und kürzlich gelang die Identifizierung des korrespondierenden Genes *thrE* (Simic *et al.*, 2001). Dieser mit LysE nicht verwandte Carrier ThrE exportiert L-Threonin und L-Serin. Sowohl LysE als auch ThrE stellen den Prototyp neuer bislang nicht charakterisierter Familien von Translokatoren dar (Vrljic *et al.*, 1999, Yen *et al.*, 2002).

Sowohl der Exportcarrier für L-Lysin, als auch für L-Threonin wurde im Zuge der Untersuchungen zur Aminosäureproduktion mit *C. glutamicum* identifiziert. Durch physiologische Untersuchungen liegen bisher auch Hinweise für die Existenz aktiver Carrier für Citrullin, Histidin, Ornithin (Bellmann, 2001) und Glutamat (Hoschen *et al.*, 1990) vor. *C. glutamicum* wurde bereits 1957 als L-Glutamat-auscheider aus Bodenproben isoliert (Kinoshita, 1957; Abe *et al.*, 1967). Heute werden mit diesem Gram positiven Bakterium rund 1.000.000 t/a L-Glutamat hergestellt (Eggeling *et al.*, 2001a, Leuchtenberger *et al.*, 1996), das vornehmlich als Geschmacksverstärker eingesetzt wird. Darüber hinaus werden ca. 400.000 t/a L-Lysin fermentativ mit *C. glutamicum* synthetisiert (Eggeling *et al.*, 2001a). Auch für L-Isoleucin ist es gelungen durch gezieltes „metabolic engineering“ Produktionsstämme von *C. glutamicum* herzustellen (Morbach *et al.*, 1996, Eggeling *et al.*, 1997). Wie auch die anderen essentiellen, verzweigtkettigen Aminosäuren L-Leucin und L-Valin, wird L-Isoleucin in der Pharmazie benötigt und beispielsweise in Infusionslösungen eingesetzt. Bei den Untersuchungen zur L-Isoleucin-Akkumulation wurde jedoch beobachtet, dass während der Kultivierung die intern Isoleucinkonzentration etwa doppelt so hoch war, wie extern im Medium vorlag

(Morbach *et al.*, 1996). Da zusätzlich die unmittelbare Biosynthesevorstufe α -Keto-methylvalerat intern akkumuliert, ist auf eine Limitierung der Produktakkumulation durch den Export von L-Isoleucin zu schließen. Aus diesem Grund könnte ein Carrier interessant sein, um damit eine gesteigerte Produktbildung zu erreichen.

Erste Hinweise auf einen Exportcarrier für L-Isoleucin in *C. glutamicum* ergaben biochemischen Untersuchungen mit ganzen Zellen. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass L-Isoleucin auch gegen einen Konzentrationsgradienten ins Medium exkretiert wird (Ebbighausen *et al.*, 1989a). Dabei folgt die Isoleucinexkretion einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_M von 21 mM und einer maximalen Geschwindigkeit von $v_{max} = 14,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$ (Zittrich & Krämer, 1994). Der Efflux erfolgt aber teilweise auch durch Diffusion, da wegen der großen Hydrophobizität ein Energie-unabhängiger Transfer von L-Isoleucin erfolgt (Abb. 1, Zittrich & Krämer, 1994). Die Diffusionskonstante beträgt $0,13 \text{ } \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$, was einer Permeabilität von $2 \cdot 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ entspricht (Zittrich & Krämer, 1994). Dies bedeutet, dass zum Beispiel bei einer zellinternen L-Isoleucinkonzentration von 54 mM, und einer externen von 16 mM, die aktive Exportrate etwa $12 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$ beträgt, und der diffusionsbedingte Efflux etwa $5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$.

Bei dem aktiv getriebenen Export (Abb. 1) handelt es sich wahrscheinlich um einen elektrogenen Isoleucin/Protonen Antiport Mechanismus, wobei die mit Isoleucin kotranslozierte Ionenspezies möglicherweise Hydroxylionen darstellen (Hermann & Krämer, 1996). Durch Konkurrenzexperimente mit ganzen Zellen wurde gezeigt, dass Leucin den Isoleucinexport um 25 % bis 43 % hemmt (Zittrich & Krämer, 1994; Hermann & Krämer, 1996). Hingegen hemmte Valin den Isoleucinexport nur um etwa 10 %. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass der vermutete Carrier auch Leucin exportiert, er aber Valin nicht, oder nur sehr gering akzeptiert (Hermann & Krämer, 1996). Aus Experimenten mit Inhibierung der Proteinsynthese ergab sich ein Hinweis, dass die Synthese des Exporters wahrscheinlich reguliert ist (Hermann & Krämer, 1996).

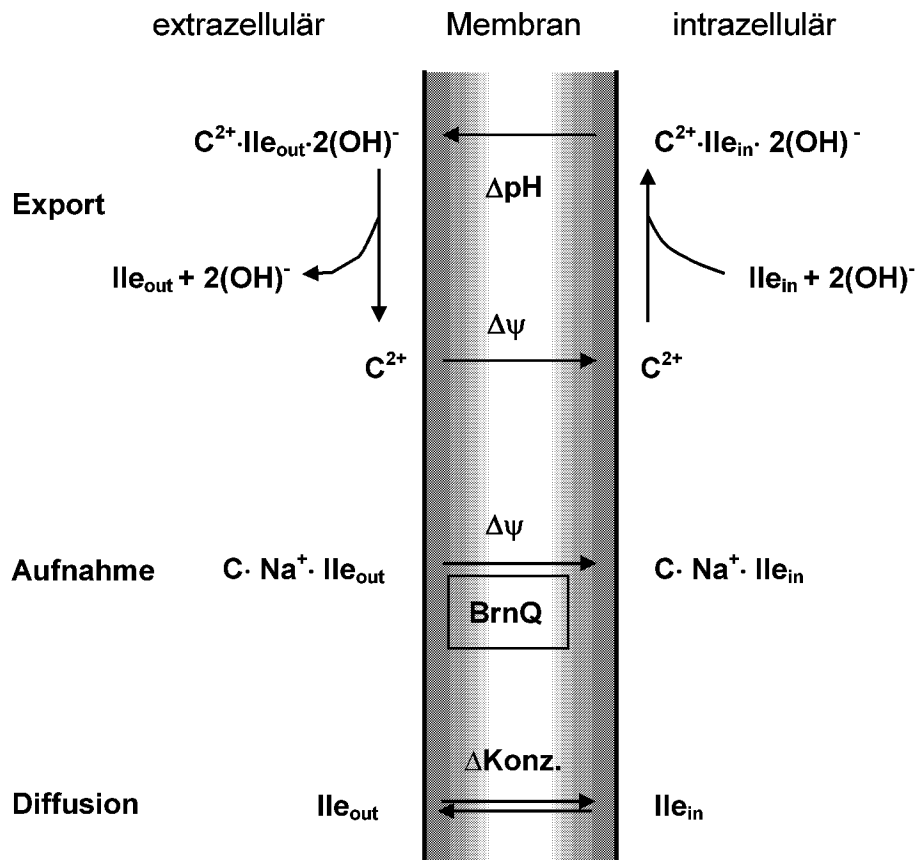


Abb. 1: Transport von L-Isoleucin bei *C. glutamicum*. Der aktiv getriebene Export erfolgt vermutlich, indem auf der cytoplasmatischen Seite der positiv geladene Carrier (C²⁺) ein Isoleucinmolekül (Ile) und zwei Hydroxylionen (OH⁻) aufnimmt. Unter Einfluß des pH-Gradienten ändert der Carrier seine Konformation und entläßt extrazellulär Isoleucin zusammen mit den Hydroxylionen. Unter Einfluß des Membranpotentials ändert der Carrier wiederum seine Konformation, um auf der intrazellulären Seite erneut für einen weiteren Transportschritt zur Verfügung zu stehen (Hermann, 1998). Die Isoleucinaufnahme erfolgt im Symport mit Na⁺-Ionen (Ebbighausen *et al.*, 1989b). Die Diffusion erfolgt entsprechend des Konzentrationsgradienten mit einer Diffusionskonstante von 0,13 µl min⁻¹ mg⁻¹ Tg (Zittrich & Krämer, 1994).

Als dritte Komponente beim Isoleucintransport, zusätzlich zu Export und Diffusion, kann grundsätzlich der Import von L-Isoleucin eine Rolle spielen. Der Import wirkt dem Export entgegen, sodass ein „futile cycle“ denkbar ist. Die Aufnahme von L-Isoleucin wird in *C. glutamicum* durch das sekundär aktive Aufnahmesystem BrnQ

vermittelt (Tauch *et al.*, 1998). Dieses ist, wie auch in vielen anderen Gram positiven Bakterien das einzige aktive Aufnahmesystem für verzweigtkettige Aminosäuren (Tauch *et al.*, 1998). Dabei erfolgt die Aufnahme wahrscheinlich im Symport mit Na^+ -Ionen (Abb. 1). Es zeigten sich unterschiedliche Affinitäten für die drei verzweigtkettigen Aminosäuren, mit einem K_M von 5,4 μM für Isoleucin, 9,0 μM für Leucin und 9,5 μM für Valin. Untersuchungen zur Regulation ergaben, dass die Aufnahmerate mit steigender interner Isoleucinkonzentration zunimmt (Boles *et al.*, 1993). Dies erscheint zunächst physiologisch nicht sinnvoll. Es ist aber denkbar, dass bei hohen internen Isoleucinkonzentrationen Isoleucin durch Diffusion „verloren geht“ und deswegen wieder vermehrt aufgenommen werden muss. Dafür wurde der Begriff cyclische Retention geprägt (Ingraham *et al.*, 1983).

Ziel dieser Arbeit war es, das Gen des Exportcarriers für verzweigtkettige Aminosäuren in *C. glutamicum* zu identifizieren. Dazu sollte eine im Isoleucinexport defekte Transposonmutante isoliert werden, um so Zugang zum Gen des Carriers zu bekommen. Die Charakterisierung des Isoleucinexporters sollte durch die Bestimmung von Exportraten mit definierten Mutanten erfolgen. Dabei sollte auch die vermutete Spezifität, sowie die mögliche Regulation des Exporters untersucht werden. Um ferner Hinweise auf die natürliche Funktion des Exporters zu erhalten, sollte untersucht werden, in welchen Organismen homologe Proteine vorkommen und welche verwandtschaftliche Beziehung besteht. Da in früheren Experimenten zur Produktion von L-Isoleucin eine Limitation durch den Transport erkennbar war, war es auch ein Ziel, den Einfluss des Exportcarriers und des Importcarriers auf die Produktion zu untersuchen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1 Bakterienstämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurde mit den folgenden Bakterienstämmen gearbeitet (Tab. 1).

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Phänotyp / Genotyp	Referenz
<u>Escherichia coli</u>		
DH5αMCR	<i>endA1 supE44 recA1 gyrA96 relA1 deoR U169</i> <i>Φ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
GM2929	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdR2 recF143 mcrA mcrB</i>	Palmer and Marinus, 1994
S17-1	<i>thi-1 F⁻ endA1 hsdR17 supE44 λ⁻ pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<u>Corynebacterium</u>		
<u>glutamicum</u>		
ATCC14752	Wildtyp	Vertes <i>et al.</i> , 1993
14752 1-8	Transposonmutante <i>14752brnF::Tn5531</i>	diese Arbeit
14752 1-25	Transposonmutante <i>14752htaA::Tn5531</i>	diese Arbeit
14752 1-75	Transposonmutante <i>14752chll::Tn5531</i>	diese Arbeit
ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
13032Δ <i>brnFE</i>	Wildtyp mit einer Deletion von 942 nt in <i>brnFE</i>	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
13032Δ <i>brnF</i>	Wildtyp mit einer Deletion von 642 nt in <i>brnF</i>	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
13032Δ <i>lrp</i>	Wildtyp mit einer Deletion von 409 nt in <i>lrp</i>	Mirja Wessel ¹
13032Δ <i>brnQ</i>	Wildtyp mit einer Deletion von 1224 nt in <i>brnQ</i>	diese Arbeit
13032:: <i>lrp</i> _{int}	Wildtyp mit einer Disruption von <i>lrp</i> durch pK18 <i>mob</i> nach 400 nt	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
DM368-2	Threonin- und Lysinproduzent, AEC ^R , AHV ^R	Reinscheidt <i>et al.</i> , 1994
MH20-22B	Lysin-Produzent, AEC ^R , <i>leuD</i>	Menkel, <i>et al.</i> , 1989

¹ Arbeitsgruppe M. Bott, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich

Tab. 1 (ff): In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

MH20-22B Δ <i>lysA</i>	MH20-22B mit einer chromosomalen Deletion von 818 nt in <i>lysA</i>	Karin Krumbach ²
MH20-22B Δ <i>brnQ</i>	MH20-22B mit einer Deletion von 1224 nt in <i>brnQ</i>	diese Arbeit
MH20-22B Δ <i>lysA</i> Δ <i>brnFE</i>	MH20-22B Δ <i>lysA</i> mit einer chromosomalen Deletion von 942 nt in <i>brnFE</i>	diese Arbeit
MH20-22B Δ <i>lysA</i> Δ <i>brnQ</i>	MH20-22B Δ <i>lysA</i> mit einer chromosomalen Deletion von 1224 nt in <i>brnQ</i>	diese Arbeit
13032 <i>brnF2</i> ::pk19 <i>brnF2</i> _{int}	Wildtyp mit einer chromosomalen Integration von pK19 <i>mobsacBbrnF-2</i> _{int}	diese Arbeit
13032 Δ <i>brnFEbrnF2</i> :: pk19 <i>brnF2</i> _{int}	Deletionsmutante von <i>brnFE</i> mit einer chromosomalen Integration von pK19 <i>mobsacBbrnF-2</i> _{int}	diese Arbeit
13032 <i>brnF2</i> ::pEM1 ' <i>brnF2</i> '- <i>lacZ</i>	Wildtyp mit einer chromosomalen, transkriptionellen <i>lacZ</i> -Fusion mit <i>brnF-2</i>	diese Arbeit
13032 Δ EG::GE- <i>lacZ</i>	Deletionsstamm von <i>lysEG</i> mit einer chromosomalen, transkriptionellen <i>lacZ</i> -Fusion mit <i>lysE</i>	Bellmann et al., 2001

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 2 aufgeführten Plasmide verwendet. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang dargestellt.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCGL0040	Donor of Tn5531 (IS1207, Km ^R), Ap ^R , <i>oriV</i> _{E.c.}	Accession U53587
pUC18	Klonierungs- und Sequenziervektor (Ap ^R)	Norlander et al., 1983
pZ1	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor (Km ^R <i>oriV</i> _{E.c.} <i>oriV</i> _{C.g.})	Menkel et al., 1989
pJC1	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor (Km ^R <i>oriV</i> _{E.c.} <i>oriV</i> _{C.g.})	Cremer et al., 1990

² Arbeitsgruppe L. Eggeling, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich

Tab. 2 (ff): In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

pK18mob	Integrationsvektor (Km^R, oriV_{E.c.} oriT)	Schäfer et al., 1994
pK19mobsacB	Integrationsvektor (Km^R, oriV_{E.c.}, oriT, sacB)	Schäfer et al., 1994
pEM1	Integrationsvektor (Km^R, oriV_{E.c.}, oriT)	Schrumpf et al., 1991
piWiT10	Donor der 3,4 kb großen lacZ-Kassette (Asp700/ XbaI-Fragment), Tc^R	Wilcken-Bergmann et al., 1986
pEK0	<i>E. coli</i>-<i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor (Km^R, oriV_{E.c.}, oriV_{C.g.})	Eikmanns et al., 1991a
pK19mobsacBΔbrnFE	pK19mobsacB mit einem um 942 nt deletierten brnFE Fragment	Kennerknecht et al., 2002
pK19mobsacBΔbrnF	pK19mobsacB mit einem um 642 nt deletierten brnF Fragment	Kennerknecht et al., 2002
pK19mobsacBΔbrnQ	pK19mobsacB mit einem um 1224 nt deletierten brnQ Fragment	diese Arbeit
pK18moblrp_{int}	pK18mob mit einem 203 nt internem Fragment von lrp	Kennerknecht et al., 2002
pK19mobsacBbrnF-2_{int}	pK19mobsacB mit einem 506 nt internem Fragment von brnF-2	diese Arbeit
pK18mob1-75_{int}	pK18mob mit einem ca. 250 nt internem Fragment von chlI	Karin Krumbach²
pTG1227 ΔSalI	pUC18 mit einem ca. 1,3 großen lysA-Fragment	Silke Görres³
pK19mobsacBΔlysA	pK19mobsacB mit einem um 818 nt deletierten Fragment von lysA	Karin Krumbach²
pEM1'brnF-2'-lacZ	pEM1 mit einem 477 nt internem Fragment von brnF-2 und dem 3,4 kb großen lacZ-Fragment aus piWiT10	diese Arbeit
pUC18Klon1-8EcoRI	pUC18 mit einem ca. 6 kb EcoRI Fragment des Insertionsortes von Tn5531 des Klons 1-8 von <i>C. glutamicum</i> ATCC14752	diese Arbeit
pUC18Klon1-8PstI	pUC18 mit einem ca. 4,3 kb PstI Fragment des Insertionsortes von Tn5531 des Klons 1-8 von <i>C. glutamicum</i> ATCC14752	diese Arbeit
pUC18brnFE-lrp	pUC18 mit einem 1.8 kb PCR Fragment von brnFElrp	Kennerknecht et al., 2002

³ Arbeitsgruppe L. Eggeling, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich

Tab. 2 (ff): In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

pUC18 <i>brnFE</i>	pUC18 mit einem 1,3 kb PCR Fragment von <i>brnFE</i>	diese Arbeit
pUC18 <i>brnE</i>	pUC18 mit einem 1,2 kb PCR Fragment von <i>brnE</i>	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
pUC18 <i>lrp</i>	pUC18 mit einem 0,65 kb PCR Fragment von <i>lrp</i>	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
pJC1 <i>brnFE</i>	pJC1 mit einem 1,3 kb PCR Fragment von <i>brnFE</i>	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
pJC1 <i>brnF</i>	pJC mit einem 0,96 kb PCR Fragment von <i>brnF</i>	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
pZ1 <i>brnE</i>	pZ1 mit einem 1,2 kb <i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i> Fragment aus pUC18 <i>brnE</i> , welches <i>brnE</i> enthält	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
pZ1 <i>lrp</i>	pZ1 mit einem 0,7 kb <i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i> Fragment aus pUC18 <i>lrp</i> welches <i>lrp</i> enthält	Kennerknecht <i>et al.</i> , 2002
pJC1 <i>brnFE</i> (His) ₆	pJC1 mit einem 1,3 kb PCR Fragment von <i>brnFE</i> , welches um 6 Hisitidincodons verlängert ist.	diese Arbeit
pJC1 <i>brnF</i> (His) ₆	pJC1 mit einem 0,94 kb <i>XbaI</i> -Fragment aus pUC18 <i>brnF</i> (His) ₆	diese Arbeit
pUC18 <i>brnF</i> (His) ₆	pUC18 mit einem 0,94 kb PCR Fragment von <i>brnF</i> , welches um 6 Hisitidincodons verlängert ist.	diese Arbeit
pECM3 <i>ilvA</i> ^{wt}	pECM3 mit einem 1,5 kb <i>ilvA</i> -Fragment, Cm ^R	Morbach <i>et al.</i> , 1996
pECM3 <i>ilvA</i> ^{wt} <i>brnFE</i>	pECM3 <i>ilvA</i> ^{wt} mit einem 1,2 kb <i>XbaI</i> Fragment von <i>brnFE</i>	diese Arbeit
pECM3 <i>ilvA</i> ³⁸	pECM3 mit einem 1,5 kb <i>ilvA</i> (V323A)-Fragment, Cm ^R	Morbach <i>et al.</i> , 1996
pECM3 <i>ilvA</i> ³⁸ <i>brnFE</i>	pECM3 <i>ilvA</i> ³⁸ mit einem 1,2 kb <i>XbaI</i> Fragment von <i>brnFE</i>	diese Arbeit
pEK0 <i>hom</i> ^{Fbr} <i>thrBC</i>	pEK0 mit einem 3,6 kb <i>hom</i> ^{Fbr} <i>thrBC</i> - Fragment aus DM368-2 und einem 2,1 kb <i>thrC</i> -Fragment aus <i>C. glutamicum</i> 13032	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991b
pEK0 <i>hom</i> ^{Fbr} <i>thrB</i>	pEK0 mit einem 3,6 kb <i>hom</i> ^{Fbr} <i>thrB</i> -Fragment aus DM368-2	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991b

Km^R, Kanamycin resistent; Ap^R, Ampicillin resistent; Tc^R, Tetracyclin resistent; Cm^R, Chloramphenicol resistent.

2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die Chemikalien, die zur Herstellung definierter Minimalmedien verwendet wurden, wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck AG (Darmstadt) oder von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen. Komplexnährmedien, die zur Kultivierung von Bakterienstämmen verwendet wurden, stammten von Difco Laboratories (Detroit, USA). Dipeptide wurden von Bachem Biochemica AG (Heidelberg) bezogen.

2.1 Nährmedien

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde das Vollmedium LB (*Luria Bertani*) nach Sambrook *et al.* (1989) oder BHI-Komplexmedium (*Brain-Heart Infusion*, Difco) verwendet. Die Anzucht von *E. coli* zur Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan (1985) erfolgte auf SOB-Medium.

C. glutamicum wurde zur Stammhaltung und DNA-Isolierung in LB-Medium kultiviert. Als Vorkulturmedium wurde *Brain-Heart Infusion* (Difco) oder CgIII-Medium (Menkel *et al.*, 1989) eingesetzt. Zur Bestimmung von Wachstumskurven, Produktbildung und Messung von Enzymaktivitäten wurde das Minimalmedium CgXII mit 4 % Glukose und 30 mg/l Protocatechuat eingesetzt (Keilhauer *et al.*, 1993). Zur Messung von Exportraten wurden das Minimalmedium MMI verwendet, das auf 0,5 g/l Ammoniumsulfat reduziert war (Hermann & Krämer, 1996; Kennerknecht *et al.*, 2002).

2.2 Zusätze zu den Medien

Zur Selektion und zur Haltung von Stämmen, die Plasmide enthalten, wurden die in Tab. 3 angegebenen Antibiotikakonzentrationen eingesetzt. Nalidixinsäure wurde eingesetzt, um nach Konjugationsexperimenten das Wachstum von *E. coli* zu unterdrücken. Um eine ausreichende Transformationseffizienz zu erreichen, musste bei *C. glutamicum* zur Selektion auf Plasmid-tragende Klone die Antibiotikakonzentration reduziert werden, die bei allen darauffolgenden Kultivier-

ungen erhöht wurde. Bei Vorliegen einer Ampicillinresistenz wurde das strukturverwandte Carbenicillin eingesetzt.

Tab. 3: Verwendete Antibiotikakonzentrationen sowie deren Stammlösungen.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>		
	Selektion und Haltung	Selektion	Haltung	Stammlösung
Carbenicillin	50 µg/ml	-	-	50 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	30 µg/ml	-	-	30 mg/ml in 50 % Ethanol
Nalidixinsäure	50 µg/ml	-	-	50 mg/ml in 0,4 N NaOH
Kanamycin	50 µg/ml	15 µg/ml	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol	30 µg/ml	3-4 µg/ml	7-10 µg/ml	25 mg/ml in 70 % Ethanol

Zur Herstellung von Mediumplatten wurde dem Nährmedium 1,5 % AgarAgar zugesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf die Expression wurde Buttersäurehydrolysat nach den Angaben von Prof. Dr. E. Schweizer (Universität Erlangen-Nürnberg) hergestellt. Dazu wurde 100 g Butter in einer KOH/MetOH (25 g KOH in 50 ml MetOH) Lösung für 1,5 h unter Rückfluss gekocht. Damit sich das Hydrolysat im Medium löst, wurde der Emulgator 1 % Brij 58 verwendet, wobei das Medium immer noch eine Trübung aufwies und somit die OD₆₀₀ nicht bestimmt werden konnte. Die OD₆₀₀ wurde daher im Vergleich zum Wachstum ohne Zusätze abgeschätzt.

2.3 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C. *C. glutamicum* wurde bei 30 °C kultiviert und zur Herstellung kompetenter Zellen nach van der Rest *et al.* (1999) bei 19 °C (Wildtyp) oder bei 25 °C (Lysinproduzent MH20-22B) inkubiert. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Das Nährmediumvolumen betrug 50-200 ml und die Schüttelgeschwindigkeit 120-130 rpm. Kleinere

Kulturvolumina wurden entweder in Reagenzgläsern, die 5 ml Medium enthielten bei 180 rpm, oder in 100 ml Erlenmeyerkolben, die mit 20 ml Medium befüllt waren, bei 150 rpm inkubiert.

Zur Aufnahme einer Wachstumskurve oder Exportrate wurden Aliquots der Vorkulturen 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert, mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, und dann in das jeweilige Minimalmedium überführt. Dabei wurde bei Wachstumsexperimenten eine anfängliche Zelldichte von $OD_{600} = 0,1$ bis 2 und zur Bestimmung von Exportraten eine OD_{600} von 10 eingestellt.

2.4 Stammhaltung

Zur Stammhaltung auf LB-Platten wurden die verwendeten Sämme alle 2-4 Wochen auf neue LB-Platten überimpft und bei 4 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 2 ml einer LB-Kultur abzentrifugiert und in 1 ml LB mit 25 % Glycerin resuspendiert. Die so erhaltenen Suspensionen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

3 Molekulargenetische Methoden

Zur Plasmidisolierung, Reinigung von DNA, zur Ligation und Polymerasekettenreaktion wurden im Wesentlichen die in Tab. 4 aufgelisteten Kits verwendet. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Kits, deren Hersteller und Verwendungszweck.

Kit	Hersteller	Verwendung
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden	Isolierung reiner DNA
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden	Isolierung reiner DNA in hohen Konzentrationen
QiaEx II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	Isolierung von DNA aus Agarosegelen
QiaCleanUp Kit	Qiagen, Hilden	Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen
NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit	Macharey & Nagel, Düren	Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen oder zur Isolierung aus Agarosegelen
SureClone™ Ligation Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden	Zur blunt end Klonierung von PCR-Produkten
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Standard-Ligationen
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung
Qiagen PCR Kit	Qiagen, Hilden	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Analyse
DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Hybridisierung und Detektion bei Southern Blot Analysen

3.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die nach Birnboim und Doly (1979) modifizierte Methode der alkalischen Lyse eingesetzt, bzw. die in Tab. 4

angegebenen Kits verwendet. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde wie bei Schwarzer und Pühler (1991) beschrieben, oder mit den in Tab. 4 aufgeführten Kits durchgeführt. In jedem Fall ist für *C. glutamicum* aufgrund des stark ausgeprägten Mureinsacculus eine vorausgehende Behandlung mit 15 mg/ml Lysozym für 1-2 h bei 37 °C nötig. Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* erfolgte nach Eikmanns *et al.* (1994). Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption in einer 1 ml Quarzglasküvette bei 260 nm bestimmt (Ultraspec 3000, Amersham Pharmacia, Upsala, Schweden). Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Als Maß der Reinheit der DNA sollte der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2 Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA

Techniken zur Restriktion, Ligation, Klenow- und Phosphatasebehandlung erfolgten im Allgemeinen nach Sambrook *et al.* (1989). Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben der Hersteller für die einzelnen Enzyme (i.d.R. Roche Diagnostics) bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur. Dabei spaltet 1 U Enzym 1 µg DNA in 1 h. Restriktionsansätze zu analytischen Zwecken wurden in einem Volumen von 20 µl und präparative Restriktionsansätze wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die Ligase des Bakteriophagen T4 nach Sambrook *et al.* (1989) bei 16°C im Wasserbad über Nacht eingesetzt. Darüber hinaus wurden die in Tab. 4 angegebenen Kits verwendet. Um eine Ligation von DNA-Fragmenten über stumpfe Enden zu ermöglichen, wurde mittels Klenowenzym das 3'-überhängende Ende abgespalten, bzw. das 5'-überhängende Ende in Anwesenheit von 0,2 µM dNTP's aufgefüllt. Die Religation von linearisierten Vektoren wurde stark reduziert, indem der Phosphatrest des 5'-Endes mittels *shrimp alkaline*-Phosphatase (USB, Bad Honnef) zuvor abgespalten wurde. Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden die in Tab. 4 aufgeführten Kits verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe in 0,8-2 %igen Agarosegelen nach Sambrook *et al.* (1989) in TAE-Puffer.

3.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet (Saiki *et al.*, 1988). Dazu wurden jeweils zwei, den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierende Oligonukleotide eingesetzt, die bei MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen wurden. Die Anlagerungstemperatur der PCR-Primer lag zwischen 58°C - 64°C. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Biozym Diagnostics (Oldendorf) durch mindestens 30 sich wiederholende Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 94 °C, Anlagerung der Oligonukleotide (*annealing*) bei 50°C - 64°C und DNA-Kettenverlängerung (*elongation*) mittels thermostabiler *Taq*-DNA-Polymerase bei 72 °C (Tindall *et al.*, 1988). Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die zur weiteren Klonierung verwendet wurden, erfolgte unter Zusatz der fehlerkorrigierenden *Pwo*-Polymerase (Barnes *et al.*, 1994), die in einem Gemisch zusammen mit der *Taq*-Polymerase im *Expand High Fidelity Kit* (Roche) vorliegt. Die optimale Anlagerungstemperatur (T_a) für die PCR wurde entweder vom Hersteller der Oligonukleotide angegeben oder aus der Basenzusammensetzung berechnet (Sambrock *et al.*, 1989), wobei nur der Bereich des Oligonukleotides berücksichtigt wurde, der bereits im ersten Zyklus an die DNA-Matrize anlagert ($T_a = (4 \times [G+C] + 2 \times [A+T]) - 4$). Die Elongationszeit betrug 1 min pro 1 kb. Als DNA-Matrize wurde chromosomale DNA sowie Plasmid-DNA eingesetzt, aber auch DNA aus aufgebrochenen Zellen. Dabei wurde eine Kolonie in 50 µl Wasser mittels Vortex (Bender & Hobein, Zürich, Schweden) resuspendiert, um die Zellen mechanisch aufzubrechen. Nach einer Inkubation der Zellen für 10 Minuten bei 95°C wurde 5 µl dieser Suspension als DNA-Matrize zur PCR eingesetzt.

Zur Herstellung von Deletionskonstrukten, die eine *in-frame* Deletion des Gens ermöglichen, wurde die *cross-over* PCR verwendet (Link *et al.*, 1997). Bei einer *in-frame* Deletion eines Genes wird die Expression stromabwärts liegender Gene nicht beeinträchtigt, und schließt somit Sekundäreffekte aus. Hier wurde in einer ersten PCR ein stromabwärts und ein stromaufwärts liegender DNA-Bereich getrennt amplifiziert. Die dazu verwendeten Oligonukleotide wurden so modifiziert, daß die entstandenen PCR-Fragmente am 5'-Ende jeweils mit einer 21 Nukleotid langen *linker*-Sequenz verbunden waren, die bei den Fragmenten zueinander komplementär ist. Zur *cross-over* PCR wurden die Produkte der ersten PCR als

DNA-Matrize verwendet, wobei über den komplementären Bereich eine Anlagerung stattfindet. Durch Einsatz der äußeren Primer wird das Deletionskonstrukt erhalten.

3.4 Transformationstechniken

Die Transformation von *E. coli* erfolgte durch Inkubation Rubidiumchlorid-kompetenten Zellen mit der einzubringenden DNA und anschließenden Hitzeschock modifiziert nach Hanahan *et al.* (1983, 1985).

Die Transformation von *C. glutamicum* erfolgte durch Elektroporation (Dunican *et al.*, 1989; Liebl *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1989). Dazu wurde nach verschiedenen Protokollen kompetente Zellen hergestellt, bei denen die Kultivierung von *C. glutamicum* stets in Anwesenheit von zellwandmodifizierenden Wachstumsinhibitoren stattfand (Haynes & Britz, 1989). Dabei wurde 4 mg/ml Isonikotinsäurehydrazid, 2,5 % (w/v) Glycin und 0,1 % (v/v) Tween80 zum Medium zugesetzt. Es wird vermutet, dass diese Substanzen die Permeabilität der Zellwand erhöhen und somit die Transformation erleichtern. Die bisher übliche Methode nach Haynes und Britz (1989, 1990) erlaubt den Transfer von Plasmiden mit relativ geringer Transformationseffizienz von 2×10^3 c.f.u. μg^{-1} xenogener DNA (*colony forming units*). Hier wird 50 ml der LB-Hauptkultur mit den Wachstumsinhibitoren mit 1 ml einer tagsüber kultivierten LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C angezogen. Bei Erreichen einer optischen Zelldichte von $\text{OD}_{600}=0,5$ werden die Zellen bei 4°C geerntet, da empirisch festgestellt wurde, dass eine Erwärmung der Zellen die Transformationseffizienz herabsetzt. Um die bei der Elektroporation störenden Salze komplett zu entfernen, wurden die Zellen viermal mit 10 %igen Glycerin gewaschen und in Aliquots von 100 μl bei -70°C gelagert. Zur Elektroporation wurden 50-100 μl Zellsuspension mit der Plasmid-DNA gemischt, in vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvetten (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Die Elektroporation wurde in dem BIORAD GENE PULSERTM (Biorad, München) bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einem kapazitären Widerstand von 25 μF durchgeführt (Liebl *et al.*, 1989). Zur Regeneration nach Transformation wurde 1 ml BHIS-Medium (BHI mit 0,5 M Sorbitol) zur Zellsuspension gegeben und in einem sterilen Eppendorfreaktionsgefäß für 60 min

bei 30°C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert, bevor die Zellen auf antibiotikahaltigen LBHIS-Agarplatten (Liebl *et al.*, 1989) ausplattiert wurden.

Durch Kultivierung der Zellen und Durchführung eines Hitzeschocks nach erfolgter Elektroporation nach van der Rest *et al.* (1999) konnte die Transformations-effizienz auf $2,5 \times 10^6$ c.f.u. μg^{-1} xenogener DNA erhöht werden. Dadurch ist es möglich, eine Integration von Plasmiden in das Genom zu erreichen. Die Kultivierung bei niedriger Temperatur bewirkt vermutlich eine höhere Permeabilität der Zellmembran und durch den Hitzeschock wird wahrscheinlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum* inaktiviert, wodurch die hohe Transformationseffizienz erreicht wird (van der Rest *et al.*, 1999). Es werden 100 ml der LB-Hauptkultur mit den Wachstumsinhibitoren mit 5 ml einer 16 h inkubierten LB-Vorkultur angeimpft und für 28 h bei 18 °C (Wildtyp) bzw. 25 °C (MH20-22B) inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 1$ werden die Zellen bei 4°C geerntet und viermal mit 10 %igem Glycerin gewaschen. Zur Elektroporation wurden 50 μl kompetenter Zellen mit 1-2 μl DNA gemischt und bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 25 μF für 10-12 ms elektroporiert (van der Rest *et al.*, 1999). Anschließend wurde die Zellsuspension in 1 ml LBHIS überführt und in einem Eppendorfreaktionsgefäß ein Hitzeschock bei 46°C für 6 Minuten im Wasserbad durchgeführt. Zur Regeneration für 90 min wurden die Zellen bei 30°C im Thermomixer inkubiert, bevor diese auf antibiotikahaltigen LBHIS-Medium ausplattiert wurden.

3.5 Plasmidtransfer von *E. coli* nach *C. glutamicum* durch Konjugation

Die Methode der Konjugation wurde verwendet, um mobilisierbare Plasmide vom Donorstamm *E. coli* S17-1 zum Rezipientenstamm *C. glutamicum* zu übertragen (Schäfer *et al.*, 1990). Zur Konjugation wurden 20 ml LB-Medium mit 0,2 % Glukose (100 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen) mit 400 μl einer LB-Vorkultur des Donorstammes angeimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 1$ wurde die Kultur auf Eis gelagert. Pro Konjugationsansatz und zu transferierendem Plasmid wurden 3 ml einer LB-Übernachtskultur ($\text{OD}_{600} = 3-8$) des Rezipienten in einem Reagenzglas einem Hitzeschock (9 min, 48,5°C) unterzogen. Der Hitzeschock dient vermutlich der Beeinträchtigung des Restriktionssystems von *C. glutamicum* bei gleichzeitiger Induktion des Reparatur-

systems der Zellen (Schäfer *et al.*, 1994). Anschließend wurden 1 ml Donorzellen mit 3 ml Rezipientenzellen in einem sterilen Reagenzglas gemischt, die Zellen 5 min bei Raumtemperatur mit 3500 rpm zentrifugiert, und nach Entfernung des Überstandes in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Um durch eine hohe Zelldichte einen engen Kontakt der beiden Stämme zu erhalten, wurde die erhaltene Zellsuspension auf ein Zellulosenitratfilter (Millipore, Typ HAWP, Porengröße 0,45 µm, Millipore S.A., Molsheim, Frankreich) aufgetragen, welches zuvor auf eine LB-Platte gelegt worden war. Nach 20 stündiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen mit 600 µl LB-Medium vom Filter abgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde auf BHI-Agarplatten ausplattiert, die 15 µg/ml Kanamycin zur Selektion auf Transkonjuganden und 50 µg/ml Nalidixinsäure, zur Unterdrückung des Wachstums von *E. coli*, enthielten. Die erhaltenen Transkonjuganden wurden erneut auf BHI-Medium, welches 50 µg/ml Nalidixinsäure und 25 µg/ml Kanamycin enthielt, übertragen.

3.6 Transposonmutagenese

Zur Transposonmutagenese von *C. glutamicum* ATCC14752 wurde das Transposon Tn5531 (Ankri *et al.*, 1996) eingesetzt, welches eine Kanamycin-resistenz Kassette trägt. Das transposontragende Plasmid pCGL0040 (Oscar Reyes, persönliche Mitteilung) wurde mit Hilfe des *QIAfilter plasmid midi* Kits (Qiagen, Hilden) aus *E. coli* GM2929 präpariert und durch Elektroporation in *C. glutamicum* 14752 eingebracht. Dieser Stamm erfordert ein abweichendes Protokoll zur Herstellung kompetenter Zellen (Oscar Reyes, persönliche Mitteilung). Daher wurde *C. glutamicum* 14752 aus einer 5 ml BHI-Vorkultur mit einer Zelldichte von $OD_{600}=0,2$ zur BHI-Hauptkultur mit 0,1 % (v/v) des Wachstumsinhibitors Tween 80 angeimpft. Bei Erreichen einer $OD_{600}=1,5$ wurden die kompetenten Zellen bei 4 °C geerntet und zweimal mit sterilem H₂O und einmal mit 10 %igem Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1/150 des ursprünglichen Volumens in 10 %igem Glycerin resuspendiert, á 100 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert. *C. glutamicum* 14752 wurde durch Elektroporation (Liebl *et al.* 1989) mit pCGL0040 bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einem kapazitären Widerstand von 25 µF

transformiert. Zur 90 minütigen Regeneration bei 30 °C wurde nach erfolgter Transformation BHIS-Medium zu den Zellen gegeben. Da pCGL0040 in *C. glutamicum* 14752 nicht replizierbar ist und das Transposon eine Kanamycin-resistenzkassette trägt, wurde auf Transposonmutanten selektioniert, indem der Transformationsansatz auf Kanamycin-haltiges LBHIS-Medium ausplattiert wurde.

3.7 Konstruktion und Nachweis von Integrations- und Deletionsmutanten von *C. glutamicum*

Die Herstellung von Deletionsmutanten von *C. glutamicum* erfolgte nach der von Schäfer *et al.* 1994 etablierten Methode mit dem Plasmid pK19*mobsacB*. Dazu wurden mittels *cross-over* PCR (Link *et al.*, 1997) oder durch Restriktion Deletionskonstrukte hergestellt, die ein DNA-Fragment mit der gewünschten Deletion enthielten und in die multiple Klonierungsstelle von pK19*mobsacB* kloniert. Da pK19*mobsacB* in *C. glutamicum* nicht replizierbar ist, wurden nach Einbringen des Plasmides und anschließender Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Kanamycinresistenz Klone isoliert, in denen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert war. Die Ausgliederung des Plasmides pK19*mobsacB* erfolgte durch ein zweites Rekombinationsereignis über die jetzt im Chromosom doppelt vorliegenden DNA-Bereiche, indem die Zellen in Vollmedium ohne Kanamycin kultiviert wurden. Anschließend wurde die Kultur auf LB-Medium mit 10 % Saccharose ausplattiert. Durch die von *sacB* kodierte Levan-Sucrase wird Saccharose zu Levan polymerisiert und es kommt zu einer induzierten Lethalität (Bramucci *et al.*, 1996). Dadurch konnten nur solche Klone wachsen, die das Plasmid ausgegliedert hatten. Bei den dann Saccharose-resistenten und Kanamycin-sensitiven Klone war entweder die genetische Wildtyp-Situation wieder hergestellt, oder die gewünschte Deletion entstanden, was durch PCR-Analysen durch Verwendung von außerhalb des Konstruktes liegenden Primern, oder Southern Blot Analyse gezeigt werden mußte. Zur Southern Blot Analyse (Southern, 1975) wurde die genomische DNA der Stämme isoliert (Eikmanns *et al.*, 1994) und ca. 5 µg mit ausgewählten Restriktionsenzymen behandelt. Nach Auftrennung der so restringierten genomischen DNA über ein 1 % Agarosegel, wurde diese mittels Vakuumblot (2016 Vacugene, LKB) auf eine Nytranmembran (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Die Markierung der

Sonde mit Digoxigenin, Hybridisierung, Waschen und Detektion erfolgte mit dem *DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set* (Tab. 4) und *CDP-Star* (Roche) entsprechend den Herstellerangaben.

Integrationsmutanten wurden erzeugt, indem in Vektoren, die in *C. glutamicum* nicht replizierbar sind, ein internes Fragment des zu unterbrechenden Genes kloniert wurde. Nach Einbringen des Plasmides durch Elektroporation oder Konjugation wurde durch Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Antibiotikaresistenz Integrationsstämme isoliert.

3.8 Herstellung von Stämmen zur Produktion von L-Isoleucin mit *C. glutamicum*

Zur Untersuchung des Einflusses des Transportes auf die Produktion von L-Isoleucin, wurden Stämme, die auf dem Lysinproduzenten MH20-22B basieren, aus den Arbeiten von Morbach *et al.* (1996) verwendet und weiter modifiziert. Zur Unterbindung der Lysinbildung wurde das *lysA*-Gen (Oguiza, 1993), das für die den letzten Schritt der Lysinsynthese katalysierende Diaminopimelatdecarboxylase kodiert, deletiert. Um das Deletionskonstrukt $\Delta lysA$ zu erhalten, wurde der Vektor pTG1227 ΔSaI , (pUC18 mit einem 1,3 kb Fragment von *lysA*) mit *EcoRV* und *DraIII* verdaut und über stumpfe Enden religiert, was zu einer internen Deletion von 818 bp in *lysA* führte. Das $\Delta lysA$ Fragment wurde in die *SmaI*-site von pK19*mobsacB* umklont und durch Elektroporation ins Chromosom von *C. glutamicum* MH20-22B integriert. Die Deletion in MH20-22B $\Delta lysA$ konnte nach der zweiten Rekombination mit den chromosomalen Primern *plysA5end-1* und *plysA3end-1* nachgewiesen werden (Tab. 19).

Um den Einfluss des Aufnahmesystems für verzweigtkettige Aminosäuren *BrnQ* auf die Produktion von Isoleucin zu charakterisieren, wurde das *brnQ*-Gen in MH20-22B deletiert. Dazu wurde das Deletionskonstrukt $\Delta brnQ$ konstruiert, indem in zwei getrennten PCRs mit P-up-for und P-up-rev (Tab. 19, Anhang) ein *upstream*- (456 bp), sowie mit P-down-for und P-down-rev ein *downstream*- (376 bp) Fragment amplifiziert. Über die komplementäre *linker*-Sequenz wurde in der dritten *cross-over* PCR mit den beiden äußeren Primern das 811 bp große Deletionsfragment erhalten, das *blunt end* in die *SmaI*-site von pK19*mobsacB*

kloniert wurde. Zur Integration des erhaltenen Plasmides pK19*mobsacBΔbrnQ* wurden *C. glutamicum* 13032, MH20-22B und MH20-22BΔ*lysA* durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock transformiert. Die Deletionen wurden in allen Stämmen nach zweiter Rekombination erhalten und mit den außerhalb des Konstruktes liegenden Primern deltaQ-up-kontr und deltaQ-down-Kontrolle nachgewiesen (Tab. 19, Abb. 2).

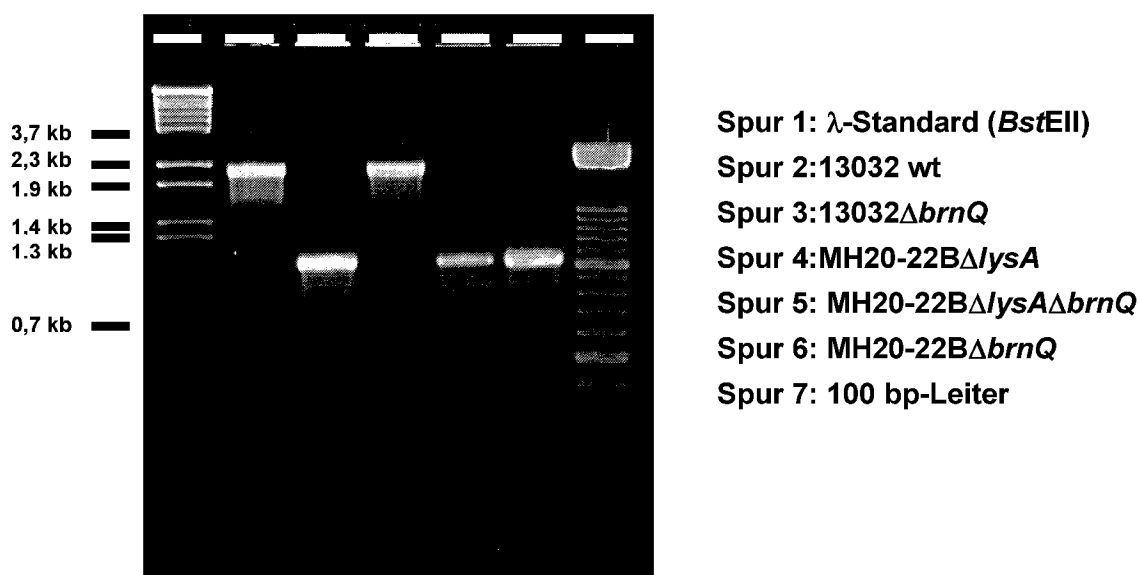


Abb. 2: 2 % Agarosegelfoto der PCR-Analysen zum Nachweis der *brnQ*-Deletion mit den außerhalb des Konstruktes liegenden Primern (deltaQ-up-kontr + deltaQ-down-Kontrolle). Bei Deletion von *brnQ* wird ein 1,1 kb, bei Wildtypsituation ein 2,3 kb großes Fragment erwartet.

Zur Überexpression der Exportergene *brnFE* zusammen mit den Isoleucinbiosynthesegenen in Produktionsstämmen, wurde der Vektor pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* konstruiert. Dazu wurde *brnFE* mit dem Restriktionsenzym *XbaI* aus pUC18*brnFE* ausgeschnitten und in die *XbaI*-site von pECM3*ilvA*^{wt} kloniert. Das Insert des so erhaltenen Vektors wurde durch Sequenzierung mit den Primern 810-222 P1 und P2 bestätigt (Tab. 19, Anhang).

Um nun die Isoleucinbiosynthesegen in Stämmen MH20-22B, MH20-22BΔ*brnQ* und MH20-22BΔ*lysA* einzubringen, wurde zunächst das Plasmid pEK0*hom*^{F_{br}}*thrBthrC* durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock eingebracht. Nach Verifizierung der richtigen Klone wurde anschließend pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* bzw. zur Kontrolle pECM3*ilvA*^{wt} eingebracht. Da diese Plasmidübertragung durch konjugativen Transfer durchgeführt wurde, wurden

beide Plasmide zunächst in *E. coli* S17-1 eingebracht und dann durch Konjugation in Stämmen von *C. glutamicum* übertragen. Die erhaltenen Stämme wurden durch Plasmidpräparation mit anschließender Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein beider Plasmide überprüft. Lediglich der erste Kontrollstamm MH20-22B Δ lysA/ pECM3ilvA^{wt} pEK0hom^{Fbr}thrBthrC wurde durch Elektroporation mit beiden Plasmiden transformiert.

3.9 Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzierung klonierter DNA erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger *et al.*, 1977. Die durch *Qiaprep Spin Miniprep Kit* oder *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden) hochreine DNA wurde mit den im Anhang angegebenen Oligonukleotiden bei der Firma Agowa (Berlin) sequenziert.

Zur Analyse sequenzierter DNA, Herstellung von Vektorkarten sowie der Suche nach offenen Leserahmen wurden die Sequenzen mit dem Programm *clone manager for windows* (Version 5.02, Scientific & Educational Software) untersucht. Erhaltene Sequenzdaten wurden mit der Datenbank des National Center of Biotechnology Information nach Altschul *et al.*, 1997 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oder mit der Datenbank des European Molecular Biology Laboratory (<http://www.embl-heidelberg.de/>) verglichen. Zur weiteren Untersuchung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde das Programmpaket von Lasergene (Bio-computing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) verwendet. Alignments sowie Hydrophobizitätsanalysen nach Kyte & Doolittle wurden mit Programmen des Baylor College of Medicine (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) durchgeführt. Um eine möglichst genaue Voraussage der Topologie der Proteine zu erhalten, wurde das Programm PHD.htm von Rost *et al.* (1995) (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>) angewendet. Um anhand von Genomsequenzen zu erfahren, welche Stoffwechselwege in bestimmten Bakterien möglich sind, wurde die Datenbank *KEGG Metabolic pathways* verwendet (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). Zur Untersuchung der phylogenetischen Verwandtschaft von Transportproteinen, sowie der Ermittlung der mittleren Hydrophobizität von Proteinfamilien wurden die Programme der Webseite <http://saier-144-37.ucsd.edu/biotools/> verwendet.

4 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Um extrazelluläre Aminosäurekonzentrationen bei Kultivierungen von Isoleucinproduktionsstämmen zu bestimmen, wurden zu den gewünschten Zeitpunkten 500 µl der Kultur entnommen und für 10 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde zur Analyse eingesetzt.

Die Quantifizierung von Aminosäuren wurde mit Hilfe der *reversed phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) durchgeführt (Jones & Gilligan, 1983). Vor der säulenchromatographischen Auftrennung erfolgte eine Derivatisierung der Aminosäuren mit dem Reagenz *o*-Phthaldialdehyd, das mit der Aminogruppe der Aminosäuren reagiert (Lindroth *et al.* 1979, Jones *et al.* 1983). Hierzu wurden je 2,5 µl der Probe mit 20 µl *o*-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol-Lösung (Pierce Europe BV, Niederlande) vermischt und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zur Auftrennung in eine RP-HPLC Säule (Hypersil ODS 5 µm, 120 x 4 mm) mit vorgeschalteter Vorsäule (Hypersil ODS 5 µm, 40 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH Langerwehe) eingespritzt. Die bei der Derivatisierung entstandenen thiosubstituierten Isoindolverbindungen wurden mit einem Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration von der Säule eluiert. Als polarer Laufpuffer diente hierbei 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2). Die Detektion der fluoreszierenden Derivate erfolgte nach Anregung bei 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Zur säulenchromatographischen Auftrennung und Detektion wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP1100 (Hewlett Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet. Die Systemsteuerung und Datenauswertung erfolgte mit dem Programm HP Chemstation (Hewlett Packard, Waldbronn).

5 Bestimmung von Exportraten

Um die Transportprozesse der verzweigtkettigen Aminosäuren charakterisieren zu können, wurde ein Test zur Bestimmung von Exportraten etabliert. Nach Erhöhung der intrazellulären Aminosäurekonzentration erfolgt der Efflux in *C. glutamicum* durch aktiven Export, aber auch entsprechend des Konzentrationsgradienten,

durch passive Diffusion (Zittrich & Krämer, 1994). Um diesen Konzentrationsgradienten ermitteln zu können, musste ein Testsystem verwendet werden, bei dem die interne Aminosäurekonzentration parallel zur externen bestimmt werden konnte. Um darüberhinaus eine sehr rasche Trennung von Zellen und Kulturüberstand zu ermöglichen, wurde die Silikonölzentrifugation eingesetzt (Klingenberg & Pfaff, 1977). Der Exportratentest erfolgte nach einer modifizierten Form der Kurzzeitfermentation nach Hoischen und Krämer (1990) mit Dipeptidzugabe.

5.1 Exportratenassay

Um den Efflux von Isoleucin, Leucin und Valin innerhalb kurzer Zeit kinetisch verfolgen zu können, wurde eine Kurzzeitfermentation mit Dipeptidzugabe durchgeführt und zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen. Dazu wurden Stämme von *C. glutamicum* über Nacht in BHI-Medium vorkultiviert. Für die Hauptkultur wurde ein Volumen von 10 ml verwendet und die optische Zelldichte OD₆₀₀ lag zwischen 8 und 12, entsprechend einem Zelltrockengewicht von 2,4 bis 3,6 mg $\times$ ml⁻¹. Ein entsprechendes Volumen der Vorkultur wurde bei 4°C geerntet und einmal mit kalter 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Das so erhaltene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Zellen wurden dann in 5 ml MMI-Medium resuspendiert und anschließend zu 5 ml auf 30 °C vorgewärmtem MMI-Medium gegeben. Dabei wurde die Kultur im Wasserbad bei 30 °C auf einem Magnetrührer (VARIOMAG, H+P, Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) bei 700 rpm gerührt. Nach einer Vorinkubation von 20 min wurde den Kulturen 0,5 - 10 mM eines entsprechenden Dipeptides zugegeben. Über einen Zeitraum von 70 min wurde zu definierten Zeitpunkten den Kulturen Proben entnommen, die zur Silikonölzentrifugation eingesetzt wurden, um die zeitgleiche Bestimmung der intrazellulären und extrazellulären Aminosäurekonzentration zu ermöglichen.

5.2 Silikonölzentrifugation

Bei der Silikonölzentrifugation erfolgt die rasche Trennung von Zellen und Kulturmedium durch eine Silikonölschicht bei gleichzeitiger Inaktivierung des Stoffwechsels der Zellen durch Perchlorsäure (Klingenberg & Pfaff, 1977), wodurch ein möglicher Abbau der intrazellulären Aminosäuren verhindert wird.

Die für die Silikonölzentrifugation eingesetzten Beckmann-Reaktionsgefäße (Beckmann Instruments GmbH, München) wurden mit 30 µl 20 %ige (v/v) Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl der Dichte 1,04 g/cm³ befüllt. Um für die spätere Analyse ausreichend Probenmaterial zu erhalten, wurde zur Probenentnahme 3 x 100 µl Zellsuspension in je drei Beckmann-Reaktionsgefäße überführt. Durch sofortige Zentrifugation für 45 sec bei maximaler Geschwindigkeit (13750 rpm) in der Microfuge E (Beckmann Instruments GmbH, München) wurden die Zellen in die Perchlorsäurephase überführt, während das zellfreie Medium aufgrund seiner geringeren Dichte als Überstand zurück blieb. Die so erhaltenen Kulturüberstände wurden zur Quantifizierung der extrazellulären Aminosäurekonzentration mittels *reversed phase* HPLC direkt eingesetzt.

Um die intrazelluläre Aminosäurekonzentration bestimmen zu können, mussten die in der Perchlorsäure vorliegenden Zellen zunächst aufgeschlossen werden (Hoischen & Krämer, 1989). Dies wurde durch eine 5 minütige Ultraschallbehandlung (Branson, Heusenstamm) erreicht und der erhaltene Extrakt wurde durch 25 µl KOH/1M Triethanolamin neutralisiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C bei 13000 rpm (Kühlzentrifuge, Sigma Company, St. Louis, USA) wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Die so erhaltenen Überstände wurden wiederum zur Aminosäurequantifizierung mittels *reversed phase* HPLC eingesetzt. Die Berechnung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen erfolgte mit folgender Formel:

$$C_{\text{int}} = \frac{(C_{\text{int, gem}} \times 100) - (C_{\text{ex}} \times 0,0599 \times \text{OD}_{600})}{0,04 \times \text{OD}_{600}}$$

C_{int} : errechnete intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]

$C_{\text{int, gem}}$: gemessene intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]

C_{ex} : gemessene extrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]

OD_{600} : Zelldichte während der Kurzzeitfermentation

Mit dieser Formel erfolgte die Berechnung der tatsächlichen intrazellulären Konzentration unter Berücksichtigung (i) der bei der Aufarbeitung des Zellpellets durchgeführten Verdünnungsschritte ($C_{\text{int, gem}} \times 100$), (ii) eines Korrekturfaktors, der den Fehler einbezieht, der durch die Aminosäurekonzentration im an den Zellen anhaftenden Medium bedingt ist ($c_{\text{ex}} \times 0,0599 \times \text{OD}_{600}$) und (iii) des intrazellulären Zellvolumens der eingesetzten Zellen ($0,04 \times \text{OD}_{600}$). Dabei wurden zugrunde gelegt, dass eine OD_{600} von 1 einem Zellrockengewicht von $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ entspricht (Gutmann, 1993) und das Zellvolumen in *C. glutamicum* $1,6 \text{ } \mu\text{l mg}^{-1} \text{ Tg}$ (Zittrich & Krämer, 1994) beträgt.

5.3 Berechnungen zur Exportrate für L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin

Nach Zugabe des Dipeptides zu Kulturen der Kurzzeitfermentationen erfolgte eine sofortige Erhöhung der intrazellulären Aminosäurekonzentration, die beim Wildtyp nach etwa 20 Minuten das Maximum erreicht hatte und über die Versuchsdauer konstant blieb. Gleichzeitig erfolgte ein Anstieg der extrazellulären Aminosäurekonzentration, der über einen Zeitraum von 70 min linear war. Daher wurde über diesen Zeitraum die Steigung der extrazellulären Aminosäurekonzentration bestimmt. Dividiert durch das Trockengewicht der Kulturen ergab sich aus dieser Steigung die Gesamteffluxrate (V_{eff}). Da der Efflux verzweigtkettiger Aminosäuren in *C. glutamicum* durch aktiven Export, passiver Diffusion und entgegengerichteter Aktivität des Aufnahmesystems BrnQ bedingt wird (Zittrich und Krämer, 1994; Tauch *et al.*, 1996), wurde der carriervermittelte aktive Export entsprechend folgender Gleichung berechnet:

$$V_{\text{ex}} = V_{\text{eff}} - K_{\text{D}} \cdot [\text{aa}]_{\text{in}} + V_{\text{in}}$$

Die aktive Exportrate (V_{ex}) wird erhalten, wenn vom Gesamtefflux (V_{eff}) die Diffusionsrate ($K_{\text{D}} \cdot [\text{aa}]_{\text{in}}$) subtrahiert und die durch das Aufnahmesystem vermittelte Aufnahme rate (V_{in}) addiert wird. Die Aufnahme rates (V_{in}) in *C. glutamicum* für die verzweigtkettigen Aminosäuren wurden von Ebbighausen *et al.* (1989b) bestimmt und sind unter den gegebenen Testbedingungen aufgrund niedriger K_{M} -Werte ($5,4\text{-}9,5 \text{ } \mu\text{M}$) konstant (Tab. 5). Die Diffusionsraten wurden bestimmt, indem

der Mittelwert der internen Konzentrationen ($[aa]_{in}$) mit der entsprechenden in Tab. 5 angegebenen Diffusionskonstante (K_D) multipliziert wurden.

Tab. 5: Aufnahmeraten und Diffusionskonstanten verzweigtkettiger Aminosäuren in *C. glutamicum*.

	L-Isoleucin	L-Leucin	L-Valin	Referenz
Aufnahmerate $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$	1,1	0,94	1,3	Ebbighausen <i>et al.</i> , 1989b
Diffusionskonstante $\mu\text{l min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$	0,13	0,13	0,09	Krämer, 1994 Millner <i>et al.</i> , 1987

6 Biochemische Methoden

6.1 Native Proteinaufreinigung von 6 x Histidin-Fusionsproteinen mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die native Aufreinigung von Membranproteinen wurde in Anlehnung an Protokolle von Guergova-Kuras *et al.* (1999) und Niebisch und Bott (2001) durchgeführt. Zur Isolierung von Membranen von *C. glutamicum* wurden entsprechende Stämme in BHI-Medium kultiviert und in der exponentiellen Phase geerntet. Das abzentrifugierte Zellpellet wurde mit Puffer R (100 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , pH 7,5; 50 mg/l DNase, 50 mg/l RNase und eine Tablette des Proteaseinhibitor Complete[®] pro 10 ml, Roche) gewaschen und in einer Verdünnung von 1 g Zellen/ 4 ml Puffer R resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in 12-15 Zyklen mit einer 40 K French Press Zelle (SLM Amicon) bei 207 MPa. Die Zelltrümmer wurden für 30 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde bei 40000 rpm für 90 min zentrifugiert um die Membranen zu pelletieren. Das Membranpellet wurde mit Puffer A (50 mM MOPS, 100 mM KCl, 25 % Glycerin; pH 7,8) gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 2 ml Puffer A resuspendiert.

Um die 6 x Histidin-Fusionsproteine aufzureinigen wurde die Ni-NTA Affinitäts-Chromatographie verwendet. Hierbei bilden die sechs Histidinreste des Fusionsproteins eine Chelatbindung mit Nickel und werden so an das Säulenmaterial (Nitrilotriacetat, NTA) gebunden (Porath *et al.*, 1975). Zur native Aufreinigung der Membranproteine, wurde das Säulenmaterial von Qiagen verwendet. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Guergova-Kuras *et al.* (1999) bei 4 °C für 45 min mit einer Endkonzentration von 1 g Dodecylmaltosid (DDM)/ g Protein in Puffer A, wobei die Dodecylmaltosidlösung tropfenweise zur ständig gerührten Proteinlösung hinzugegeben wurde. Die Proteinlösung wurde mit Puffer A so verdünnt, dass eine Konzentration von 10 mg Protein pro ml Puffer A vorlag. Diese Suspension wurde auf eine Ni-NTA-Agarose Säule von Qiagen, die zuvor mit Puffer B (50 mM MOPS, 10 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 20 % Glycerin, 10 mM Imidazol und 0,01 % DDM, pH 7,8) equilibriert war, gegeben und die Säule mit bis zu 33 Säulenvolumen Puffer B gewaschen. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm als Maß der Proteinkonzentration bestimmt, bis sie den Wert von 0,01 unterschritten hat. Anschließend wurden die Proteine durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 200 mM mit Puffer B eluiert.

Ebenfalls unter nativen Bedingungen wurden Rohextrakte von *E. coli* hergestellt. Dazu wurden die Zellen aus einer BHI-Kultur in der späten exponentiellen Phase geerntet, mit Puffer R gewaschen und anschließend in Puffer R resuspendiert. Durch eine Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W-250, Branson Power, Danbury, USA) für 5 min bei einer Ultraschallstufe von 2,5 und einem Pulsmodus von 20% wurden die Zellen aufgeschlossen. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer für 20 min bei 13.000 rpm und alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C. Um die *E. coli* Membranen und die löslichen Proteine des Rohextraktes voneinander zu trennen, wurde eine Ultrazentrifugation für 70 min bei 50.000 rpm durchgeführt. Das so erhaltene Membranpellet wurde in Puffer A resuspendiert und zur Protein- und Western-Blot-Analyse eingesetzt.

6.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Rohextrakten beruhte auf dem Prinzip der Reduktion von Cu^{2+} durch Proteine zu Cu^{1+} und anschließender Komplexierung der Cu^{1+} Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem bei 562 nm absorbierenden Farbkomplex (Smith *et al.*, 1985). Die Analyse wurde mit dem BCA-Kit (Pierce Chemical Company, USA) durchgeführt und als Standard wurden 10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg und 200 µg *bovine serum albumine* (BSA) eingesetzt.

6.3 Protein- und Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels *NuPAGE*[®] System (Invitrogen, Groningen) analysiert. Die Auftrennung erfolgte in 12 %igen Bis-Tris Polyacrylamidgelen, wobei zur Probenvorbereitung ein vom Hersteller mitgelieferter Lithium-dodecylsulfathaltige (LDS) Ladepuffer verwendet wurde. Um im Bereich zwischen 6 und 30 kDa die größte Auftrennung zu erzielen, wurde ein MES-haltiger (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) SDS-Laufpuffer verwendet (50 mM MES, 50 mM Tris, 1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3). Zur Größenabschätzung wurde der vorgefärbte Standard See Blue[™] (14-200 kDa) von Invitrogen verwendet. Die Proteine wurden mit Hilfe eines kolloidalen Coomassie-Farbstoffes (GelCode[®] Blue Stain Reagent, Pierce) für eine Stunde direkt angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Waschen für 1 h in H_2O entfernt. Alternativ erfolgt die Anfärbung nach Görg *et al.* (1985) mit Silbernitrat.

Zum Transfer der Proteine auf eine Membran wurde das *XCell II*[™] Blot Modul von Invitrogen verwendet. Dazu wurde zunächst das Bis-Tris Gel mit den aufgetrennten Proteinen in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 10-20 % Ethanol) für 15 min equilibriert. Anschließend wurden die Proteine nach Angaben des Herstellers für 1 h bei 30 V mit Transferpuffer auf eine Nitrocellulose- (*Hybond-C*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) oder PVDF-Membran (*Immobilon-P* Membran, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) geblottet. Die Blockierung freier Proteinbindestellen der Membran erfolgte ent-

sprechend dem Detektionsprotokoll von Qiagen durch Inkubation mit 3 % BSA (w/v) in TBST-Puffer (0,5 M NaCl, 0,05 % Tween 20 (v/v) und 20 mM Tris-HCl pH 7,5) für 1 h. Die Detektion erfolgte anschließend wahlweise mit Anti-(His)₆ Antikörpern (Qiagen, Hilden) und sekundärem Kaninchen-Anti-Maus-alkalische-Phosphatase Antikörper (Pierce) oder direkt durch Ni-NTA-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Qiagen, Hilden), wobei der Nachweis über die chromogene Reaktion der alkalischen Phosphatase (AP) mit NBT/BCIP (Sigma-Aldrich) erfolgte (Blake *et al.*, 1984). Zur Größenabschätzung detektierter Proteine wurden der 6 x His Protein Standard (15-100 kDa) von Qiagen verwendet.

6.4 Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS Analyse

Die Analyse von Proteinen erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie modifiziert nach Schaffer *et al.* (2001) und wurde von Steffen Schaffer⁴ durchgeführt. Dazu wurden die mit kolloidalem Coomassie angefärbten Proteinbanden aus Polyacrylamidgelen (NuPAGE) ausgeschnitten und zunächst zweimal mit 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 %igem (w/v) Acetonitril gewaschen. Die so erhaltenen Gelstücke wurden in einer Vakuumzentrifuge komplett getrocknet und anschließend in 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) mit Trypsin rehydratisiert. Zum Verdau der Proteine wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Peptide wurde durch Zusatz von 30 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure aus dem Gel eluiert. Ein Aliquot von 0,5 µl dieser Lösung wurde mit 0,5 µl Matrixlösung (20 mg α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in 1 ml 50 % (v/v) Acetonitril, 0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure) auf einer Trägerplatte vermischt. Die anschließende Analyse erfolgte mit einem *PerSeptive Biosystems Voyager-DETM STR* Massenspektrometer (PerSeptive Biosystems, Langen), wobei zur Kalibrierung der *Sequazyme Peptide Mass Standard Kit* (Applied Bioscience, Weiterstadt) verwendet wurde. Der Vergleich der monoisotopischen Peptidmassen mit den theoretischen Massen einer Datenbank aller corynebakteriellen Peptiden, wurde eine Zuordnung der Proteine ermöglicht. Dafür wurde das Programm *Gpmaw* (Version 4.0) verwendet.

⁴ Arbeitsgruppe M. Bott, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich

6.5 Bestimmung von β -Galaktosidase Aktivität

Zur Herstellung von Rohextrakten zwecks Messung der β -Galaktosidase Aktivität wurden Zellen von *C. glutamicum* in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,25 g Silikabeads (0,13-0,15 μ m, BioSpec Products, Bartlesville, Oklahoma, USA) gemischt und 4 x 15 sec in einem Amalgamator (Silamat, Vivadent) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand zur Messung der Enzymaktivität eingesetzt. Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde nach Miller (1972) kolorimetrisch bestimmt. Dabei wird vom Substrat ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-Galactosid) durch die Galactosidase Aktivität das bei 420 nm absorbierende *o*-Nitrophenol abgespalten. Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte nach der folgenden Gleichung:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{Volumen [ml]} \times \Delta \text{Extinktion}}{4,5 \times \text{Zeit [min]} \times \text{ml Extrakt} \times \text{Protein [mg/ml]}}$$

III. ERGEBNISSE

1 Isolierung und Charakterisierung Peptid-sensitiver Transposonmutanten

Da in *C. glutamicum* L-Isoleucin auch gegen einen Konzentrationsgradienten ins Medium ausgeschieden wird (Ebbighausen *et al.*, 1989a), kann dies nur durch die Anwesenheit eines aktiven Carriers erklärt werden. Durch die biochemischen Experimente von Zittrich und Krämer (1994) war es darüberhinaus möglich, den aktiven Isoleucinexport von der passiven Diffusion und der aktiven Aufnahme zu unterscheiden. Versuche zur molekularen Identifizierung des Carriers mittels 2D-Gelelektrophorese waren bisher erfolglos (T. Hermann, Dissertation, 1998).

Um das Gen des Isoleucinexportcarriers nun identifizieren zu können, sollte zunächst eine im Export defekte Mutante isoliert werden. Um ungerichtete Mutanten zu erzeugen, wurde die Transposonmutagenese (Ankri *et al.*, 1996) in *C. glutamicum* eingesetzt, da hier durch eine geschickte Subklonierungsstrategie mit anschließender Sequenzierung direkt der durch das Transposon unterbrochene Genlocus identifiziert werden kann.

1.1 Screeningsystem auf Peptidsensitivität

Um eine im Isoleucinexport defekte Mutante isolieren zu können, musste ein geeignetes Screeningsystem etabliert werden. Dabei wurde die Beobachtung zu Grunde gelegt, dass das Wachstum einer im Lysinexport defekten Mutante sensitiv gegenüber Lysin-haltigen Peptiden ist (Vrljic *et al.* 1996). Ebenso zeigt eine im Threoninexport defekte Mutante eine Wachstumsverzögerung in Anwesenheit Threonin-haltiger Peptide. Daher wurde das Screeningsystem für eine im Isoleucinexport defekte Mutante unter Verwendung von Isoleucyl-Isoleucin etabliert. Diese Vorgehensweise beruhte auf der Erkenntnis, dass *C. glutamicum* dieses Dipeptid aufnehmen und intrazellulär hydrolysieren kann, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Isoleucinkonzentration führt (Zittrich & Krämer, 1994).

Um die ideale Dipeptidkonzentration zu ermitteln, bei der *C. glutamicum* 14752 bereits eine minimale Wachstumshemmung zeigt, wurde ein Plattentest durchgeführt. Dazu wurden Agar-Platten mit CgXII-Minimalmedium hergestellt, die 1 bzw. 3 mM Isoleucyl-Isoleucin enthielten. Im Sektorenausstrich zeigte sich bei 3 mM Dipeptid ein leicht verschlechtertes Wachstum, wohingegen das Wachstum in Anwesenheit von 1 mM Dipeptid vergleichbar mit dem der Kontrolle ohne Dipeptid war. Da L-Isoleucin in *C. glutamicum* nicht metabolisiert werden kann, sollte im Falle eines Exportdefektes bei 3 mM Isoleucyl-Isoleucin eine verstärkte interne Akkumulation bis zu toxischen Konzentrationen von Isoleucin vorliegen, wodurch die Wachstumshemmung verstärkt ausfallen sollte.

1.2 Transposonmutagenese und Isolierung Peptid-sensitiver Mutanten

Die Transposonmutagenese wurde in *C. glutamicum* 14752 mit dem Transposon Tn5531 durchgeführt (Ankri *et al.*, 1996). Dieses Transposon besteht aus einer Kanamycinresistenzkassette, die an beiden Seiten von den Insertionselementen IS1207 flankiert wird. Das sonst übliche Wildtypisolat *C. glutamicum* 13032 konnte nicht verwendet werden, da damit keine unspezifischen Integrationen erzeugt werden können (A. Burkovski, Universität Köln, persönliche Mitteilung). Datenbankrecherchen der kürzlich veröffentlichten Genomsequenz von *C. glutamicum* 13032 zeigten, dass das auf Tn5531 vorhandene Insertionselement IS1207 im Chromosom vorliegt (Ax127151, Kyowa Hakko GmbH), wodurch eine spezifische Integration vermutlich durch homologe Rekombination möglich ist und dieser Stamm somit ungeeignet für die ungerichtete Mutagenese mit diesem Transposon ist. Daher wurde die Transposonmutagenese im Wildtypisolat *C. glutamicum* 14752 durchgeführt.

Nach Transformation von *C. glutamicum* 14752 mit dem Tn5531 tragenden Vektor pCGL0040 durch Elektroporation, wurden insgesamt ca. 2400 Transposonmutanten erhalten. Die Kolonien waren erwartungsgemäß heterogen in ihrer Größe und z.T. auch unterschiedlich gefärbt. Die ersten Kolonien zeigten sich nach zwei Tagen, aber auch nach sechs Tagen erschienen noch weitere Klone. Es wurden 1800 der erhaltenen Klone im Plattentest mittels Zahnstocheraustrich auf Sensitivität gegenüber 3 mM Isoleucyl-Isoleucin überprüft, indem die einzelnen Klone auf CgXII-Minimalmedium mit und ohne Dipeptid übertragen wurden. 124

Klone zeigten eine leichte Wachstumshemmung in Anwesenheit des Dipeptides im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid. In einem nachfolgenden Sektorenausstrich wurden diese erneut auf Peptidsensitivität überprüft, wobei bei 10 Klonen das reduzierte Wachstum in Anwesenheit des Peptides bestätigt werden konnte. Da der Effekt der Peptidsensitivität im allgemeinen relativ schwach ausfiel, wurde der Phänotyp von vier Klonen in Flüssigkultur vergleichend mit 3 mM Isoleucyl-Isoleucin bzw. ohne Peptid untersucht (Abb. 3).

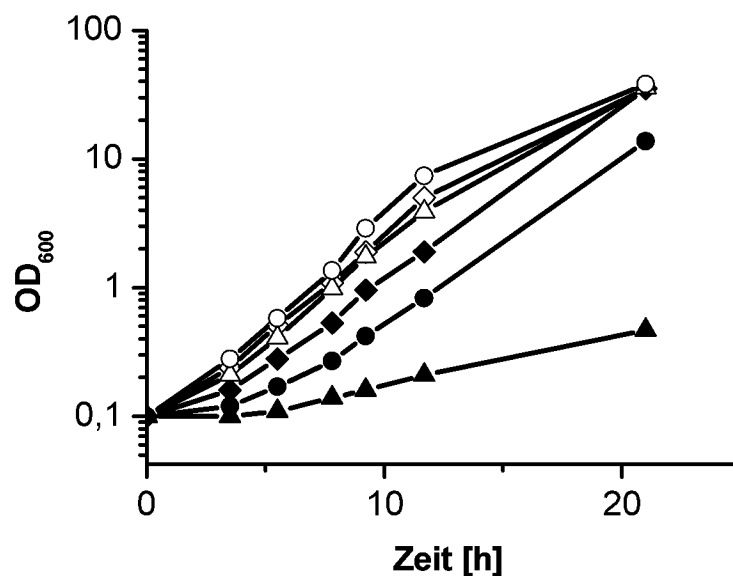


Abb. 3: Wachstum Peptid-sensitiver Transposonmutanten im Vergleich zum Kontrollstamm *C. glutamicum* 14752/ pJC1 in CgXII mit 4 % Glucose und mit (geschlossene Symbole) oder ohne (offene Symbole) 3 mM Isoleucyl-Isoleucin: 14752/ pJC1 (◆); 14752Klon 1-8 (▲) und 14752Klon 1-75 (●).

Drei der Transposonmutanten (Klon 1-25, Klon 1-75 und Klon 1-77) zeigten ein nur leicht verzögertes Wachstum in Anwesenheit des Peptides, was exemplarisch für Klon 1-75 in Abb. 3 dargestellt ist. Das Wachstum der Klone 1-25 und 1-77 war mit dem von Klon 1-75 vergleichbar. Eine der Transposonmutanten (Klon 1-8) zeigte ein stark verzögertes Wachstum in Anwesenheit des Peptides. Ohne Dipeptid wuchsen alle Transposonmutanten vergleichbar wie der Kontrollstamm *C. glutamicum* 14752/ pJC1. Bei allen vier Klonen war demnach möglich, dass sie eine durch Tn5531 verursachte Disruption im Gen des potentiellen Isoleucin-exportergens tragen.

1.3 Identifizierung des Insertionsortes des Transposons Peptid-sensitiver Mutanten

Um zu ermitteln, welches Gen durch das Transposon Tn5531 unterbrochen war, mußte der Insertionsort kloniert und ansequenziert werden.

Dazu wurde zunächst die chromosomale DNA der vier Mutanten isoliert. Um das Transposon-tragende DNA-Fragment zu erhalten, wurde die chromosomale DNA mit bestimmten Restriktionsenzymen verdaut. Dabei wurde *EcoRI* verwendet, um den DNA-Bereich stromaufwärts der Integrationsstelle zusammen mit der Kanamycinresistenzkassette zu erhalten (Abb. 4). *XbaI*, bzw. *PstI* wurde verwendet, um das stromabwärts liegende Fragment zu erhalten.

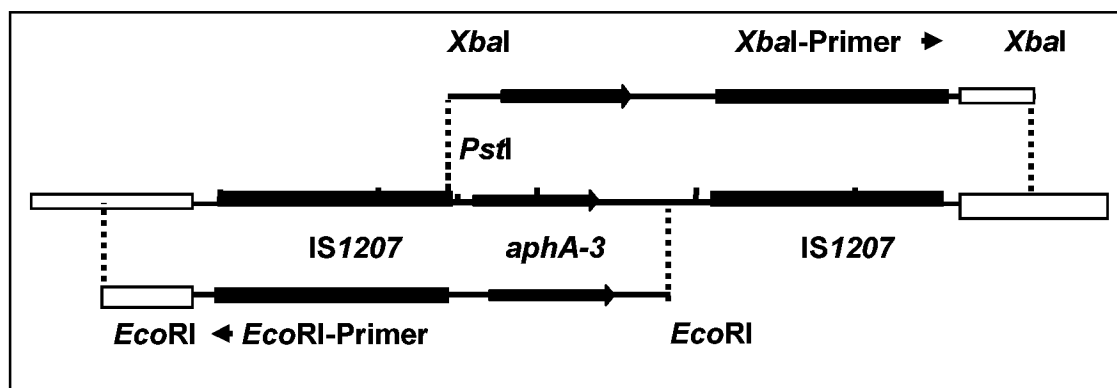


Abb. 4: Prinzip der Klonierung des Insertionsortes von Tn5531. In der Mitte ist der Transposonisationsort einer Mutante gezeigt. Durch Restriktion der chromosomalen DNA mit *EcoRI* wird ein Fragment stromaufwärts der Insertionsstelle zusammen mit dem Kanamycinresistenzgen (*aph-3*) und dem Insertionselement IS1207 erhalten, durch Restriktion mit *XbaI* (oder *PstI*) wird entsprechend das stromabwärtsgelegene Gen erhalten.

So konnten bei der Klonierung der Fragmente in die entsprechende Restriktionschnittstelle des Klonierungsvektors pUC18 durch Selektion auf Kanamycinresistenz, Plasmide mit Fragmenten erhalten werden, die den Teil des Transposons mit dem angrenzenden DNA-Bereich enthielten. Ein Überblick über die klonierten Fragmente ist in Tab. 6 gegeben.

Die Inserts der so erhaltenen Plasmide wurden mit innerhalb von Tn5531 anlagernden Primern ansequenziert. Für den stromaufwärts liegenden Bereich wurde der *EcoRI*-Primer verwendet, für den stromabwärts liegenden DNA-Bereich

der *Xba*I-Primer. Im Falle der Klone 1-8 und 1-77 gelang es von beiden Seiten die Sequenzen des Transposoninsertionsortes zu erhalten. Diese wurde mit dem Programm *Clone Manager* fusioniert und alle Sequenzen anschließend auf mögliche offene Leserahmen untersucht. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit dem im Internet zur Verfügung stehenden Programm BLASTX (Altschul *et al.*, 1997) auf mögliche verwandte Proteine anderer Organismen untersucht. Die Ergebnisse der Datenbankanalysen und der Überblick über die Klonierung sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Charakterisierung der Peptid-sensitiven Mutanten mit einem Überblick über die Klonierungen und Identifizierung der Transposoninsertionsorte.

Mutante	Klonierung ^b		Wachstums- raten ^a [h ⁻¹]	Identifizierung des Transposon- insertionsortes
	<i>Eco</i> RI	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I		
Klon 1-8	✓	✓	0,09	abgeleitetes Protein zeigt zu 28 % Identitäten zu dem putativen Transporter AzlC aus <i>B. subtilis</i>
Klon 1-25	✓	-	0,20	abgeleitetes Protein zeigt zu 28 % Identitäten zu dem putativen Häm-Transporter HtaA aus <i>C. ulcerans</i>
Klon 1-75	-	✓	0,24	abgeleitetes Protein zeigt ab 60 bp zu 62 % Identitäten zu einer putativen Magnesium Chelatase Untereinheit (ChII) aus <i>M. tuberculosis</i>
Klon 1-77	✓	✓	0,25	die Nukleotidsequenz zeigt zu 97 % Identität zum stromabwärts gelegenen Bereich des Chloramphenicol-transporters Cmr aus <i>C. glutamicum</i> , Jäger <i>et al.</i> (1997)

^a Wachstumsraten in Anwesenheit von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin, der Kontrollstamm *C. glutamicum* 14752 zeigte eine Wachstumsrate von 0,29 h⁻¹.

^b Eine erfolgreiche Klonierung ist durch ein Häkchen markiert.

1.4 Untersuchungen der Transposonmutanten

Wie bereits beschrieben, zeigten drei der Transposonmutanten eine zwar leichte, aber deutliche Peptidsensitivität. Dies wird durch den Vergleich der Wachstumsraten in Anwesenheit von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin mit dem Kontrollstamm deutlich (Tab. 6). Um Hinweise zu bekommen, wodurch die Peptidsensitivität bedingt sein könnte, wurde eine Charakterisierung der Transposonmutanten vorgenommen. Dazu wurden weitere phänotypische Untersuchungen durchgeführt und darüberhinaus wurde versucht, die identifizierten DNA-Bereiche gezielt zu inaktivieren.

Die Datenbankanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des in Klon 1-75 unterbrochenen DNA-Bereichs ergab 60 bp stromaufwärts starke Homologien zum Genprodukt einer putativen Mg^{2+} -Chelatase Untereinheit. Die Sequenz ist in der Datenbank unter der Zugangsnummer AF454055 hinterlegt. Da hier eine Unterbrechung in dem möglichen Promotorbereich des Gens vorliegt, kommt es möglicherweise zu dessen veringelter Expression. Die Identitäten wurden zu verschiedenen Organismen festgestellt, beispielsweise zu Mg^{2+} -Chelatase Untereinheiten ChII (bzw. Bchl) und ChID aus phototrophen Bakterien (Xiong *et al.*, 1998). Auch *M. tuberculosis* besitzt das Gen der möglichen Mg^{2+} -Chelatase Untereinheit, dessen Protein zu 62 % identisch mit dem aus *C. glutamicum* ist. Es wurde festgestellt, dass bei *E. coli* eine veränderte Lipidzusammensetzung der Membran in erhöhtem Bedarf an zweiwertigen Ionen resultiert (DeChavigny *et al.*, 1991). Daher kann spekuliert werden, dass ein noch unverstandener Zusammenhang zwischen diesem Enzym und der Zellwandsynthese in *C. glutamicum* besteht. Es wurde deswegen überprüft, ob der Peptid-sensitive Phänotyp von Klon1-75 durch die Zugabe von zweiwertigen Ionen komplementiert werden kann (Abb. 5).

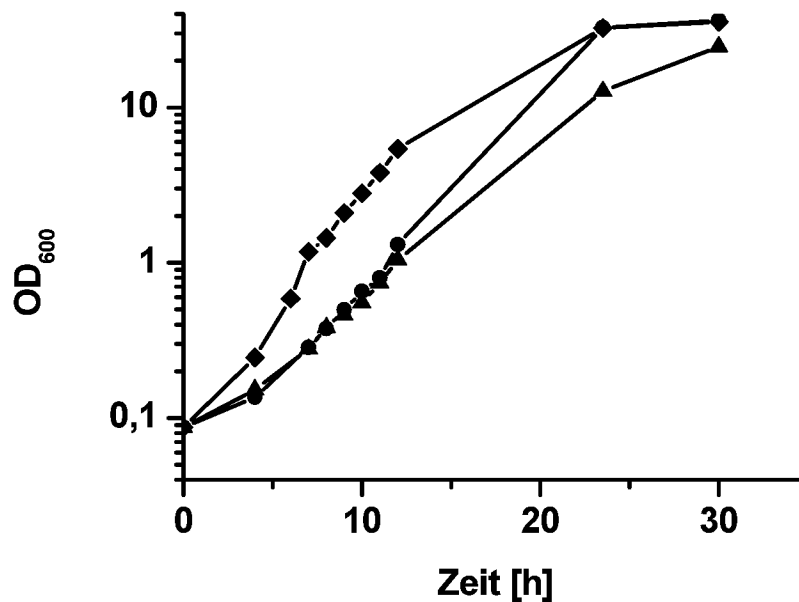


Abb. 5: Untersuchung zur erhöhten Bedürftigkeit von *C. glutamicum* 14752Klon1-75 in Anwesenheit von Isoleucyl-Isoleucin für zweiwertige Ionen. Das Wachstum in CgXII-Minimalmedium ist durch Rauten dargestellt (◆), CgXII mit 3 mM Dipeptid durch Punkte (●) und CgXII mit 3 mM Dipeptid und 5 mM CaCl₂ durch Dreiecke (▲).

Aus Abb. 5 ist ersichtlich, dass die Peptidsensitivität nicht durch die Zugabe von CaCl₂ aufgehoben wird, sondern im Gegenteil das Wachstum eher noch schlechter ist. Die entsprechenden Wachstumsraten des Stammes *C. glutamicum* 14752 Klon 1-75 betragen in CgXII-Minimalmedium 0,36 h⁻¹, unter Zugabe von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin 0,23 h⁻¹ und bei Zugabe von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin plus 5 mM CaCl₂ 0,21h⁻¹. Ähnliches wurde in Wachstumsexperimenten unter Zugabe von 20 mM MgCl₂ beobachtet, wobei hier eine spezifische Hemmung durch MgCl₂ in einem separaten Experiment ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Mit dem Versuchsziel, das Gen der putativen Mg²⁺-Chelatase *chlI* zu inaktivieren, wurde mit Primer p1-75Xbafor und p1-75Xbarev ein ca. 250 Nukleotide (nt) großes internes Fragment von *chlI* amplifiziert und in die *SmaI* Schnittstelle von pK18*mob* kloniert. Durch konjugativen Transfer nach *C. glutamicum* 13032 wurde in mehreren Ansätzen versucht, Integrationsmutanten herzustellen, wobei ins-

gesamt 53 potentielle Integranten entstanden sind. Diese wurden in PCR-Analysen mit der aus der Insertorientierung abgeleiteten Primerkombination RSP und p1-75out untersucht. In keinem Fall konnte aber mit diesem vektoriellen und dem chromosomalen Primer ein Fragment amplifiziert werden, was nahe legt, dass pK18*mob*1-75 an einer anderen Stelle im Genom inseriert war. Da es offensichtlich nicht möglich war, eine Inaktivierungsmutante des *chl* Gens herzustellen und da in der Transposonmutante die Integration im mutmaßlichen Promotorbereich stattfand, ist es möglich, dass dem Genprodukt eine essentielle Bedeutung zukommt. Die Vergleiche der Nukleotidsequenz mit der kürzlich veröffentlichten Sequenz von *C. glutamicum* 13032 (Kyowa Hakko, AX127150) zeigen in diesem DNA Bereich eine 100 %ige Übereinstimmung mit der von *C. glutamicum* 14752, was auf eine starke Konservierung hindeutet.

Bei Klon 1-25 war Tn5531 in ein Gen inseriert, dessen Genprodukt 28 %ige Identität zu einem putativen Häm-Transporter (HtaA) aus *C. ulcerans* zeigte. Die Sequenz ist in der Datenbank unter der Zugangsnummer AF454054 hinterlegt. Zur Konstruktion eines Inaktivierungsvektors sollte durch eine PCR ein internes Fragment des putativen *htaA*-Gens amplifiziert werden, um nachfolgend in den Integrationsvektor pK18*mob* kloniert zu werden. Dabei gelang es jedoch nicht, mit den Primern p1-25for und p1-25rev das gewünschte Fragment zu erhalten. Sequenzvergleiche der aus *C. glutamicum* 14752 erhaltenen Nukleotidsequenz mit den kürzlich veröffentlichten Genomdaten von *C. glutamicum* 13032 (Kyowa Hakko Co., AX127144) zeigten in diesem DNA-Bereich lediglich eine Übereinstimmung bei 517 nt von 579 nt, was eine Abweichung von ca. 10 % bedeutet. Da auch 5 nt des benutzten Primers p1-25for nicht mit der Sequenz von *C. glutamicum* 13032 übereinstimmten, konnte vermutlich wegen nicht erfolgter Hybridisierung kein Fragment erhalten werden.

Die Integration von Tn5531 bei Klon 1-77 war in einem intergenischen Bereich zwischen den beiden Genen *cmr* (Chloramphenicol resistenz) und *clpB* (Protease) (Jäger *et al.*, 1997) erfolgt. In diesem Bereich befinden sich zusätzlich zwei offene Leserahmen, die für ca. 130 Aminosäuren große Proteine kodieren könnten. Das Transposon erzeugte hier bedingt durch den Integrationsmechanismus eine direkte Sequenzwiederholung von 8 bp stromaufwärts und 8 bp stromabwärts der

Integrationsstelle, deren Basenabfolge 5'-[CCT AAA AC]-3' lautet. Von den 863 vorliegenden Nukleotiden dieses Bereiches sind 848 identisch mit der Genomsequenz von *C. glutamicum* 13032 (Kyowa Hakko Co. AX127154), was einer Abweichung von 1,7 % der beiden Wildtypisolate bedeutet. Hier wurde versucht, den gesamten intergenischen DNA-Bereich mit p1-77for und p1-77rev zu amplifizieren, wobei allerdings kein Fragment in der PCR erhalten wurde. Wie sich jetzt herausgestellt hat, ist der Primer p-77rev anhand einer vorläufigen Genomsequenz, die von Degussa zur Verfügung gestellt wurde, ausgewählt worden, die aber nicht der tatsächlichen entspricht.

Bei Klon 1-8 war das Transposon in ein Gen inseriert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz zu 28 % Identität zu AzlC aus *B. subtilis* aufwies (Belitsky *et al.*, 1997). Da dieses Protein einen Anteil von mehr als 50 % hydrophober Aminosäuren in der Sequenz aufweist, konnte es sich hier um ein Membranprotein und damit um den gesuchten Isoleucinexporter handeln. Um zu untersuchen, ob in dieser Mutante ein Einfluss auf den Export von Isoleucin vorliegt, wurde ein Kurzzeitexperiment durchgeführt. Dazu wurden aus CgIII-Vorkulturen 10 ml CgXII-Hauptkulturen mit einer OD₆₀₀ von 8 angeimpft und die Ansätze für 120 min bei 30°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t=0 wurde 1 mM Isoleucyl-Isoleucin zugegeben und alle 10 Minuten Proben abgenommen. Diese wurden zur Silikonölzentrifugation eingesetzt, um die intrazelluläre und extrazelluläre Aminosäurekonzentration bestimmen zu können. Die Ergebnisse der Analyse von Klon 1-8 im Vergleich zu *C. glutamicum* 14752/ pJC1 ergab folgendes Bild (Abb. 6).

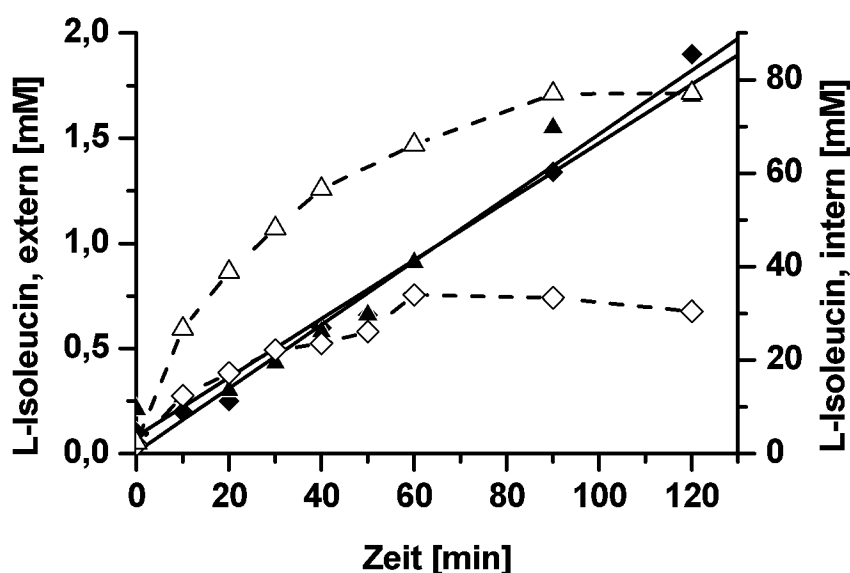


Abb. 6: Kurzzeitfermentation in CgXII-Medium mit Zugabe von 1 mM Isoleucyl-Isoleucin bei $t=0$. Aufgetragen ist die externe (linke Achse, durchgezogene Linien) sowie die interne (rechte Achse, gestrichelte Linien) Isoleucinkonzentration gegen die Zeit bei einer Kultivierung für 120 min von *C. glutamicum* 14752/ pJC1 (◆), sowie *C. glutamicum* 14752 Klon1-8 (▲).

Es zeigte sich bei Klon 1-8 eine verstärkte interne Isoleucinakkumulation nach Zugabe des Dipeptides. Die fast identisch verlaufende Zunahme der externen Konzentration scheint zunächst überraschend. Da Isoleucin jedoch eine sehr hydrophobe Aminosäure ist und damit die Diffusion einen erheblichen Anteil am Efflux hat (Zittrich & Krämer, 1994), wird bei steigender interner Konzentration auch eine gesteigerte Diffusionsrate verursacht. Die Transposonmutante Klon 1-8 ist offensichtlich nicht in der Lage, durch den Export von Isoleucin die interne Akkumulation zu reduzieren. In diesem Fall erfolgt der erhöhte Efflux durch erhöhte Diffusion. Auch wenn in diesem Experiment keine Quantifizierung der Exportrate erfolgte, deutete das Ergebnis bereits stark daraufhin, dass in Klon 1-8 der aktive Export von Isoleucin stark beeinträchtigt ist, was höchstwahrscheinlich durch die Inaktivierung des Isoleucinexportcarriers bedingt war.

2 Untersuchungen zum Export verzweigtkettiger Aminosäuren

2.1 Isolierung des *brnFEIrp* Genclusters aus *C. glutamicum* 13032 und Sequenzvergleich

Um weitere Arbeiten mit dem in Klon 1-8 identifizierten Genort durchzuführen, musste zunächst die komplette Sequenz erhalten werden. Dazu wurden die Inserts der bei der Klonierung der Insertionsorte hergestellten Plasmide pUCKlon1-8*EcoRI* und pUCKlon1-8*PstI* weiter sequenziert. Durch Verwendung der Sequenzierungsprimer 810-51 F1/F2 wurde der Bereich stromaufwärts und mit 810-79-F1 stromabwärts des Transposoninsertionsortes aus *C. glutamicum* 14752 erhalten. Die Analyse des DNA-Bereichs mit dem Programm *Clone Manager* ergab das Vorliegen von drei offenen Leserahmen. Wie schon das Genprodukt des durch Tn5531 unterbrochenen Genes, zeigte das Protein des stromabwärts gelegenen offenen Leserahmens über 50 % hydrophobe Aminosäuren. Das stromaufwärts gelegene dritte Gen liegt in divergenter Orientierung und kodiert für einen mutmaßlichen Regulator. Durch Tn5531 war in diesem Fall eine direkte Sequenzwiederholung von 8 bp erzeugt worden, deren Basenabfolge 5'-[ACT TAT CT]-3' lautet.

Um das gesamte Gencluster auch aus *C. glutamicum* 13032 isolieren zu können, wurde mit den Primern *brnE*-lower und *Irp*-upper ein ca. 1,8 kb großes Fragment mittels PCR amplifiziert und in die *SmaI*-site von pUC18 kloniert. Die Sequenz wurde doppelsträngig mit den in Tab. 19 angegebenen Primern bestimmt. Sie ist in der Datenbank unter der Accessionnummer AF454053 hinterlegt. Vergleiche der Nukleotidsequenz beider Wildtypisolate ergaben eine Abweichung von 13 nt von 1659, was einer Abweichung von 0,8 % entspricht. Die abgeleiteten Proteinsequenzen zeigen im Fall des putativen Regulators und des kleineren hydrophoben Proteins keine Abweichung, sondern eine völlig identische Peptidsequenz. Jedoch sind Unterschiede im N-terminalen Bereich des zu AzlC homologen Proteins zu verzeichnen, wobei in *C. glutamicum* 14752 an zwei Positionen ein Glycinrest statt einer negativ geladenen Aminosäure vorliegt (E21→G und D23→G). Da bei *C. glutamicum* 14752 unter Zugabe von Isoleucyl-

Isoleucin Export von Isoleucin beobachtet wurde, ist zu schliessen, dass es sich bei diesen Aminosäuren nicht um für die Funktion wichtige Reste handelt (Abb. 6). Das durch Tn5531 direkt inaktivierte Gen ist in *C. glutamicum* 13032 756 nt groß und kodiert für ein hydrophobes Protein von 27.300 Da (Abb. 7).

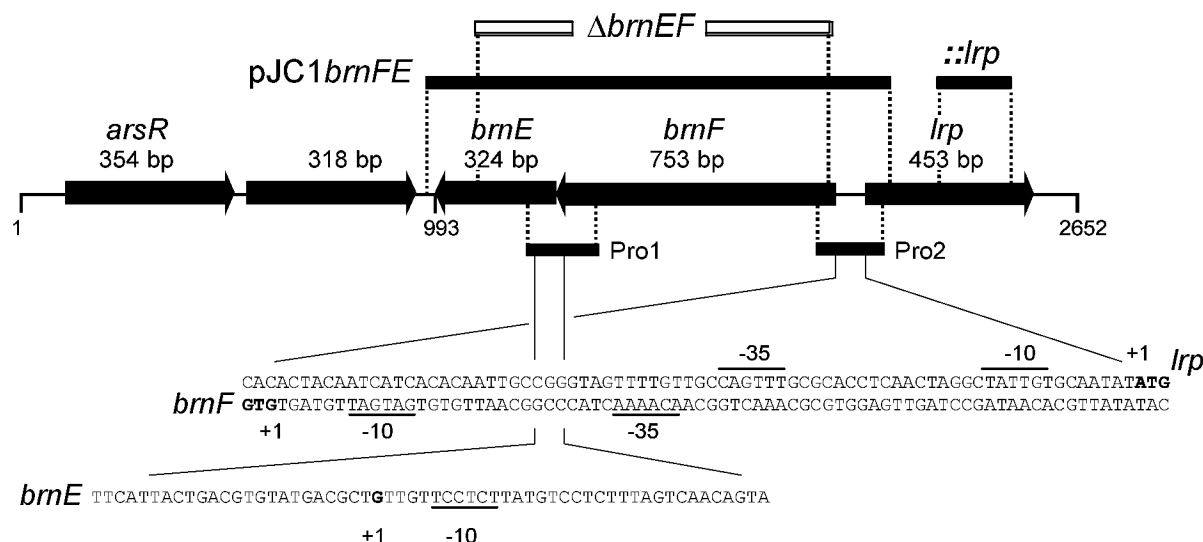


Abb. 7: Überblick über den *brnF-brnE-lrp* Gencluster aus *C. glutamicum*. Die dickeren Pfeile markieren die Gene, wobei stromabwärts von *brnE* ein hypothetisches Gen und das Gen eines an der Arsenresistenz beteiligten Regulators (*arsR*) lokalisiert sind. Über der Genanordnung sind zwei Fragmente in Form von schwarzen Balken dargestellt, die zur Plasmidkonstruktion zur Überexpression von *brnFE* und zur Inaktivierung des *lrp*-Gens verwendet wurden. Der weiße Balken markiert den Bereich, der in der *brnFE*-Deletionsmutante deletiert wurde. Die schwarzen Balken unterhalb der Gene, die mit Pro1 und Pro2 beschriftet sind, markieren Fragmente, die in Primer-Extension Experimenten von Mirek Patek⁵ auf Promotoraktivität untersucht wurden. Die angegebenen Sequenzen unter den Promotorfragmenten zeigen die mit +1 beschrifteten identifizierten Transkriptionsstarts der Gene, sowie deren -10 und -35 Regionen (Kennerknecht *et al.*, 2002). Die Startcodons von *brnF* und *lrp* sind fett gedruckt. Durch das klonierte Pro1-Fragment wird zwar ein *brnE*-Transkript erhalten, da das mögliche Startcodon aber erst 119 nt stromabwärts des Transkriptionsstartes liegt, trägt dieses Transkript wahrscheinlich nicht zur Peptidbildung bei.

⁵ Institute of Microbiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republik

Es überlappt um vier Nukleotide mit einem stromabwärts gelegenen Gen von 327 nt, dessen 11.500 Da Protein Identitäten zu AzlD aus *B. subtilis* zeigt. Bei dieser Überlappung 5'-[ATGA]-3' sind zwei Nukleotide (5'-[TG]-3') sowohl Teil des Stoppcodons, als auch des Startcodons des nachfolgenden Gens. Diese Situation wird häufig bei in Operons transkribierten Genen beobachtet (Normark *et al.*, 1983). Im Einklang mit den nachfolgend durchgeführten Analysen wurden die Gene *brnF* und *brnE* für *branched chain amino acid exporter* benannt (Abb. 7). Beide Proteine zeigen begrenzte Bereiche hoher Hydrophobizität, welche auf Transmembranhelices hindeuten. In divergenter Orientierung stromaufwärts von *brnF* ist das Gen eines putativen Regulators lokalisiert, dessen abgeleitete Proteinsequenz zu 37 % mit Lrp (*Leucine responsive regulatory protein*) aus *E. coli* identisch ist (Haney *et al.*, 1993).

2.2 Stammkonstruktionen und Untersuchungen zur Funktion des *brnFE*lrp Genclusters in *C. glutamicum*

Um eine weitere Charakterisierung der durch *brnF*, *brnE* und *lrp* kodierten Proteine durchführen zu können, wurden Stämme konstruiert, in denen die Gene deletiert bzw. inaktiviert waren. Um ein Deletionskonstrukt für die gemeinsame Deletion von *brnF* und *brnE* herzustellen, wurde die Methode der *cross-over* PCR nach Link *et al.* (1997) verwendet. Da bei dieser Methode der Leserahmen des zu deletierenden Gens erhalten bleibt (*in-frame*-Deletion), wird garantiert, dass stromabwärts gelegene, in einem möglichen Operon transkribierte Gene weiter exprimiert werden können. Zur Konstruktion des $\Delta brnFE$ -Fragmentes wurde in einer ersten PCR ein stromabwärts liegender DNA-Bereich von 560 bp (mit Primer A und Primer B, Anhang, Tab. 19) und ein stromaufwärts liegender DNA-Bereich von 330 bp (mit Primer C und Primer D) getrennt amplifiziert. In der zweiten PCR wurden die PCR-Produkte der ersten PCR als *template* eingesetzt und durch den Einsatz der beiden äußeren Primer A und Primer D das Deletionsfragment amplifiziert. Dabei erfolgt die Anlagerung der beiden PCR-Fragmente über eine 21 nt lange, komplementären *linker*-Sequenz, die durch die inneren Primer (Primer B und Primer C) eingefügt worden war. Nach Restriktion der über die PCR-Primer

eingefügten Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* wurde das erhaltene Fragment gerichtet in die multiple Klonierungsstelle des Integrationsvektors pK19*mobsacB* kloniert. Die Sequenz im Insert des resultierenden Vektors pK19*mobsacB*Δ*brnFE* wurde durch Sequenzierung bestätigt. Zur Integration des Vektors wurde pK19*mobsacB*Δ*brnFE* in *C. glutamicum* 13032 durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock eingebracht, wobei nach Selektion auf Kanamycinresistenz ein Klon erhalten wurde, der die durch den Vektor vermittelte Saccharosesensitivität aufwies. Durch Kultivierung dieses Klons ohne den Zusatz von Kanamycin und Saccharose, wurde durch eine zweiten Rekombination die Ausgliederung des Vektors ermöglicht. Das Vorliegen der gewünschten Deletion wurde durch PCR von 10 Klonen mit den entsprechenden Kontrollprimern Delta-*brnFE*-Kontr und *Irp*-upper bei drei Klonen nachgewiesen (Abb. 8).

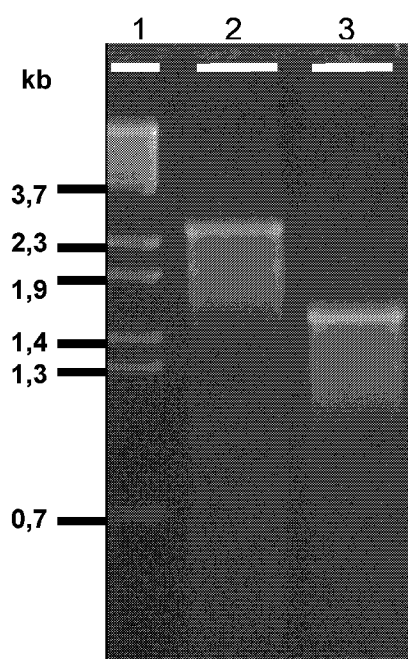


Abb. 8: PCR-Analyse auf Deletion von *brnFE* in *C. glutamicum*: durch ein 2 %iges Agarosegel-Foto wurde die *brnFE*-Deletion mit außerhalb des Konstruktes liegenden Primern *Irp*-upper und Delta-*brnFE*-Kontr nachgewiesen. In Spur 1 ist der λ -Standard *Bst*Ell-verdaut, in Spur 2 die PCR mit dem Wildtyp und in Spur drei die PCR mit der Deletionsmutante aufgetragen. Es wurde im Wildtyp eine Fragmentgröße von 2,5 kb und in der Deletionsmutante 1,6 kb erwartet.

Darüberhinaus wurde die Deletion des weiter verwendeten Klons mit einer Southern Blot Analyse bestätigt (Abb. 42, siehe Anhang). Da die Deletion der Gene ohne Probleme möglich war, handelt es sich bei *brnF* und *brnE* offenbar nicht um essentielle Gene.

Um *brnFE* sowohl gemeinsam, als auch getrennt überzuexprimieren, wurden die Gene durch PCR amplifiziert und anschließend in den *multi-copy* Vektor pJC1 oder pZ1 kloniert (Cremer *et al.*, 1991). Zur gemeinsamen Klonierung von *brnF* mit *brnE* wurde mit den Primern upper-*brnFE* und lower-*brnFE* ein ca. 1,3 kb großes Fragment amplifiziert und über *Xba*I-Schnittstellen in das *multi-copy* Plasmid pJC1 kloniert. Zur Klonierung der Einzelgene wurde unter Verwendung des selben upper Primers mit lower-*brnF* ein ca. 1 kb großes *brnF* Fragment amplifiziert und in die *Xba*I-site von pJC1 kloniert. Das *brnE*-Gen wurde mit *brnE*-upper und *brnE*-lower amplifiziert und zunächst in die *Sma*I-site von pUC18 kloniert. Aus diesem Vektor wurde *brnE* als *Eco*RI/ *Xba*I Fragment isoliert und nach Auffüllen der Enden in die *Sca*I-site von pZ1 kloniert. Zur Überexpression wurden die Plasmide in *C. glutamicum* 13032 oder *C. glutamicum* 13032 Δ *brnFE* eingebracht.

Die so hergestellten Stämme mit verschiedener Kopienzahl von *brnF* und *brnE* wurden zunächst in Wachstumsexperimenten charakterisiert. Dazu wurden die Stämme in CgXII-Minimalmedium parallel mit und ohne Zugabe von Isoleucyl-Isoleucin kultiviert. In den Wachstumsversuchen zeigte sich, dass das Wachstum der *brnFE*-Deletionsmutante in Flüssigkultur mit dem des Wildtyps ohne Zugabe des Peptides vergleichbar war (Abb. 9A). Die Funktion von *brnFE* ist unter den verwendeten Kulturbedingungen demnach nicht essentiell. Durch Einbringen von pJC1*brnFE* in die *brnFE*-Deletionsmutante, konnte der Peptid-resistente Phänotyp des Wildtyps wieder erhalten werden. Diese Komplementation konnte aber nicht erreicht werden, wenn die Gene einzeln (pJC1*brnF* oder pZ1*brnE*) in die Deletionsmutante eingebracht worden waren (Abb. 9B). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass beide Genprodukte an der Dipeptidresistenz beteiligt sind.

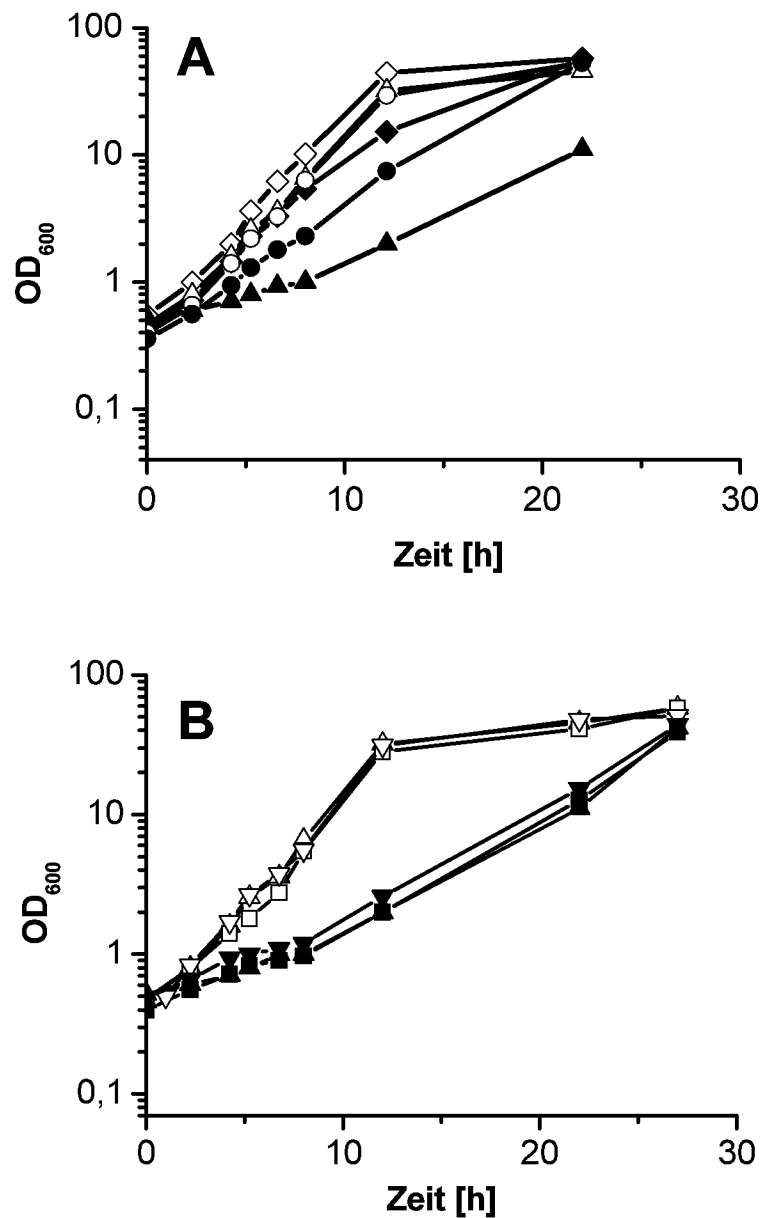


Abb. 9: Untersuchung zur Peptidsensitivität bei Stämmen mit verschiedener Expression von *brnF* und *brnE* in *C. glutamicum* durch Wachstumsexperimente. Die Kultivierung erfolgte mit (geschlossene Symbole) und ohne (offene Symbole) 5 mM Isoleucyl-Isoleucin in CgXII mit 4 % Glucose und die optische Dichte bei 600 nm aufgetragen. Folgende Stämme wurden in A kultiviert: 13032/ pZ1(◆), 13032Δ*brnFE*/ pJC1(▲), 13032Δ*brnFE*/ pJC1*brnFE* (●). in B: 13032Δ*brnFE*/ pJC1 (▲), 13032Δ*brnFE*/ pJC1*brnF* (▼), 13032Δ*brnFE*/ pJC1*brnE* (■).

Da in *B. subtilis* die Deletion der zu *brnFE* homologen Gene, *azlCD* die Azaleucin-resistenz verhindert (Belitsky *et al.*, 1997), wurden die rekombinanten Stämme auf ihr Verhalten gegenüber Azaleucin überprüft. Dazu wurde *C. glutamicum* 13032/ pZ1, 13032/ pJC1*brnFE* und 13032 Δ *brnFE*/ pJC1 in CgXII-Medium mit und zur Kontrolle ohne 0,5 mM Azaleucin kultiviert. Obwohl die Wachstumsrate des Wild-typs bereits bei dieser Konzentration von 0,35 h⁻¹ auf 0,15 h⁻¹ reduziert war, beeinflusste weder die Deletion noch die Überexpression von *brnFE* das Wachstum in Anwesenheit von Azaleucin (siehe auch Tab. 16, Kap. 3). Dies lässt vermuten, dass Azaleucin anders als in *B. subtilis* kein Substrat von BrnFE ist.

2.3 Quantifizierung von Isoleucin-Exportaten in *C. glutamicum* bei unterschiedlicher Expression von *brnFE*

Um die funktionelle Analyse der durch *brnFE* kodierten Proteine durchzuführen, wurden Exportaten in Anwesenheit von Isoleucyl-Isoleucin gemessen. Bereits in den Arbeiten von Zittrich and Krämer (1994) wurde gezeigt, dass die Zugabe dieses Peptides zu einem erhöhten und über kurze Zeit konstanten, intrazellulären Spiegel von L-Isoleucin führt. Die cytoplasmatische Isoleucinkonzentration wird durch die Aufnahmerate des Dipeptides (Zittrich & Krämer, 1994), sowie dessen Hydrolyse und dem Efflux von Isoleucin bestimmt. Dabei setzt sich der Gesamtefflux aus dem aktiven Export, der passiven Diffusion, sowie der entgegengerichteten aktiven Aufnahme zusammen.

Zur Bestimmung der Exportrate wurde eine Kurzzeitfermentation über 70 min in Minimalmedium MMI (Hermann & Krämer, 1996; Kennerknecht *et al.*, 2002) mit Zugabe von Isoleucyl-Isoleucin zum Zeitpunkt t=0 durchgeführt.

Nach Zugabe von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin wurde eine erhöhte interne Isoleucin-konzentration bis 23 mM im Stamm 13032/ pJC1*brnFE*, bis 45 mM in 13032/ pZ1 und bis zu 87 mM im Deletionsstamm 13032 Δ *brnFE*/ pJC1 festgestellt (Abb. 10, Tab. 7). Ohne Zugabe von Peptid wird in *C. glutamicum* unter identischen Bedingungen eine interne Isoleucinkonzentration von 2 mM nicht überschritten (Daten nicht gezeigt). Aus der Zunahme der extrazellulären Isoleucinkonzentration dividiert durch das Trockengewicht der Kultur, wird die Effluxrate für Isoleucin

erhalten. Überraschenderweise ist der Gesamtefflux in allen Stämmen fast identisch, was durch den vergleichbaren Anstieg der extrazellulären Isoleucin-konzentration in Abb. 10 deutlich wird. Diese Beobachtung ist jedoch die Folge der starken Diffusion von L-Isoleucin (Zittrich & Krämer, 1994), die beträchtlich zum Gesamtefflux beiträgt. Diese Carrier-unabhängige Komponente des Flusses wird lediglich durch den Konzentrationsgradienten von Isoleucin über die Membran bestimmt und ist somit bei hohen internen Konzentrationen verstärkt.

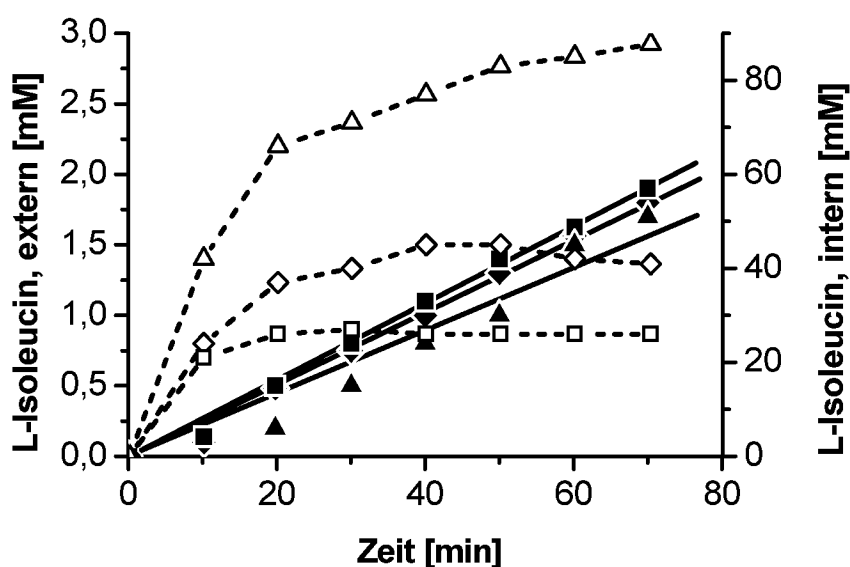


Abb. 10: Interne (offene Symbole) und externe Isoleucinkonzentration (geschlossene Symbole) von 13032/ pZ1 (◆), 13032ΔbrnFE/ pJC1 (▲) und 13032/ pJC1brnFE (■). nach Zugabe von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin.

So beträgt die Diffusionsrate, unter Zuhilfenahme der bekannten Diffusionskonstante von $0,13 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Zittrich & Krämer, 1994), bei einer internen Konzentration von 76 mM $9,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Bei der geringeren Konzentration von 25 mM im Überexprimierer beträgt diese aber lediglich $3,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Die dem Isoleucinefflux entgegenwirkende Aufnahme rate besitzt einen K_M -Wert für Isoleucin von $5,4 \mu\text{M}$ und erreicht damit unter den Testbedingungen die maximale Geschwindigkeit v_{max} von $1,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Ebbighausen *et al.*, 1989b; Tauch *et al.*, 1997). Demzufolge ergibt sich die aktive Exportrate aus der Differenz des Gesamtefflux und der Diffusion, zuzüglich der Aufnahme rate. Eine Beispielrechnung für das in Abb. 10 dargestellte Experiment ist in Tab. 7 auf-

geführt. Durch Anwendung dieser Berechnung wird in diesem Experiment eine aktive Exportrate von $6,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für den Überexprimierer und $0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für die Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp von $3,9$ erhalten.

Tab. 7: Darstellung der einzelnen Parameter zur Berechnung der aktiven Exportrate von L-Isoleucin in *C. glutamicum*.

Stamm	Effluxrate ^a	Diffusionsrate ^a		Aufnahmerate ^a	Exportrate ^a
		[Ile] _{in} ^b (mM)	[Ile] _{in} x K _D ^c		
Wildtyp	7,7	38	4,9	1,1	3,9
13032Δ <i>brnFEI</i>	8,8	76	9,8	1,1	0,1
pJC1					
13032/ pJC1 <i>brnFE</i>	8,7	25	3,2	1,1	6,6

^a Alle Raten sind in $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$ angegeben.

^b [Ile]_{in} gibt die mittlere interne Isoleucinkonzentration an.

^c Die Diffusionsrate wird durch Multiplikation der internen Isoleucinkonzentration mit der Diffusionskonstante $K_D=0,13 \text{ } \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$ berechnet.

Um zu verdeutlichen, wie stark der Anteil der passiven Diffusion am Gesamtefflux von L-Isoleucin in *C. glutamicum* ist, wurde unter den identischen Bedingungen der Export beim Wildtyp untersucht und dabei durch Zugabe des Entkopplers CCCP, der Protonen durch die Zellmembran transportiert, das Membranpotential abgebaut (Benz & McLaughlin, 1983). Dazu wurde eine Kurzzeitfermentation mit Zugabe von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin durchgeführt und nach 40 min , bei maximaler interner Isoleucinkonzentration, $20 \text{ } \mu\text{M}$ CCCP zugegeben. Da ebenfalls die Aufnahme des Dipeptides, wie auch die von Isoleucin, abhängig vom Membranpotential erfolgt (Zittrich & Krämer, 1994), wurde eine rasche Abnahme der internen Isoleucinkonzentration nach Zugabe des Entkopplers erwartet. Daher wurde nach der Zugabe in kurzen Zeitabständen, von $2,5 \text{ min}$ über einen Zeitraum von 10 min Proben genommen, die zur Silikonölzentrifugation eingesetzt wurden. Parallel erfolgte eine Kurzzeitfermentation des Wildtyps ohne Zugabe des Entkopplers. Die erhaltenen Isoleucinkonzentrationen sind in Abb. 11 dargestellt.

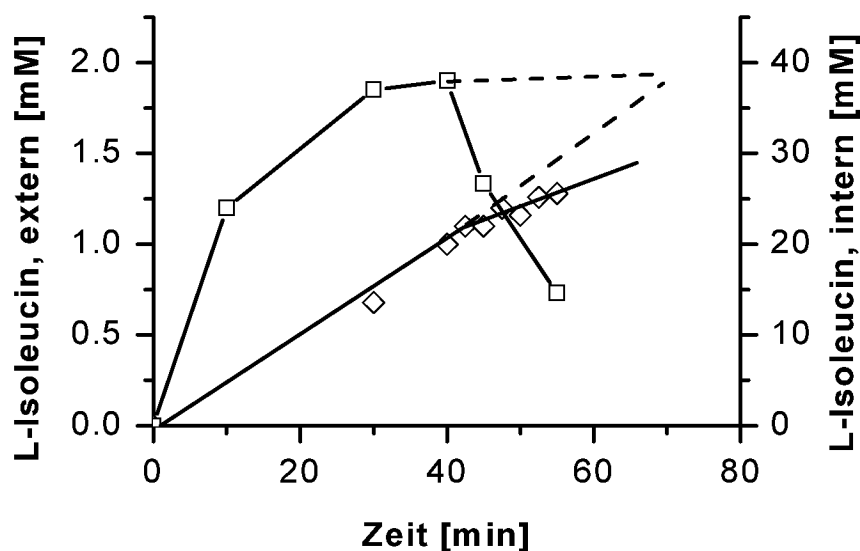


Abb. 11: Kurzzeitfermentation mit *C. glutamicum* 13032/ pZ1 mit 3 mM Isoleucyl-Isoleucin. Durch die Quadrate sind die internen und durch die Rauten die externen Isoleucinkonzentrationen dargestellt. Nach 40 min erfolgte die Zugabe von 20 μ M CCCP, wodurch die interne Konzentration stark abfiel und die Zunahme der externen Konzentration mit geringerer Geschwindigkeit erfolgte (durchgezogene Linie). Die gestrichelten Linien geben die Isoleucinkonzentrationen an, die ohne Zugabe des Entkopplers in einer parallel durchgeführten Kultivierung erhalten wurden.

Dieses Experiment zeigt, dass nach Zugabe von CCCP die interne Isoleucinkonzentration wie erwartet abfällt. Gleichzeitig ist die Zunahme der externen Konzentration drastisch reduziert. Die anfängliche Effluxrate vor Zugabe des Entkopplers betrug $7,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Da durch Zugabe von CCCP der aktive Transport von Isoleucin nicht mehr möglich ist, ist die bestimmte Effluxrate von $4,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ auf passive Diffusion zurückzuführen. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem nach Zittrich und Krämer (1994) berechneten Wert (Tab. 7) überein. Er zeigt, dass die Verwendung dieser unter anderen Bedingungen ermittelte Diffusionskonstante zulässig ist.

Da die Effluxrate der *brnFE*-Deletionsmutante des in Tab. 7 dargestellten Experimentes nur deshalb so hoch ist, weil durch die hohe interne Isoleucin-

konzentration eine verstärkte Diffusion bedingt ist, sollte bei einer dem Wildtyp entsprechenden internen Konzentration der Gesamtefflux bei *brnFE*-Deletion reduziert sein. Um vergleichbare interne Isoleucinkonzentrationen einzustellen, wurde eine Kurzzeitfermentation durchgeführt, bei der zum Überexprimierer 10 mM, zur *brnFE*-Deletionsmutante 0,5 mM und zum Wildtyp 3 mM Isoleucyl-Isoleucin zugegeben wurde. Das Ergebnis der internen und externen Isoleucinkonzentrationen ist in Abb. 12 dargestellt.

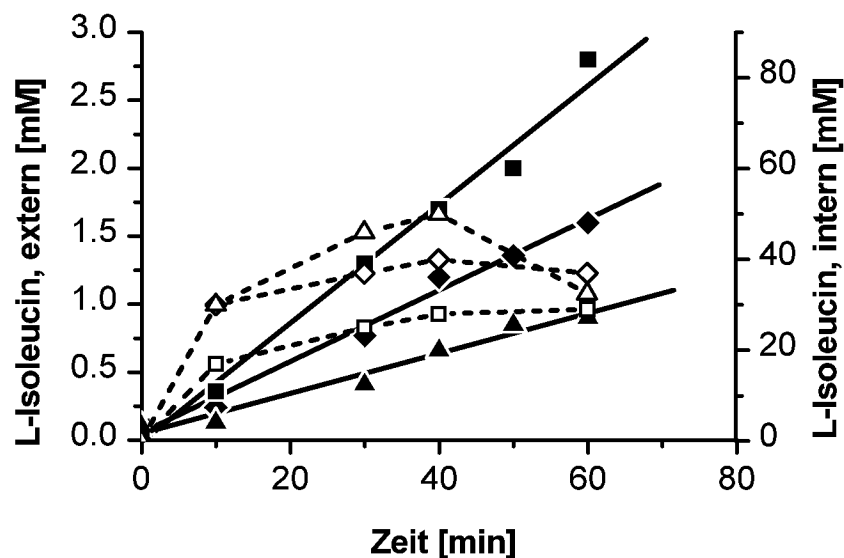


Abb. 12: Interne (offene Symbole) und externe Isoleucinkonzentration (geschlossene Symbole) von *C. glutamicum* 13032/ pZ1 (◆) nach Zugabe von 3 mM Dipeptid, 13032Δ*brnFE*/ pJC1 (▲) nach Zugabe von 0,5 mM Dipeptid und 13032/ pJC1*brnFE* (■) 10 mM Dipeptid.

Es bestätigte sich, dass der Efflux am höchsten mit dem Stamm 13032/ pJC1*brnFE* und am niedrigsten in der Deletionsmutante war. Entsprechend waren die berechneten Exportraten mit denen im vorigen beschriebenen Experiment vergleichbar. In Tab. 8 sind die Mittelwerte der Exportraten mit Standardabweichung dargestellt. Diese Experimente bestätigen, (i) dass der aktive Isoleucinexport durch *brnFE*-Expression resultiert, und (ii) machen es unwahrscheinlich, dass ein zusätzlicher Carrier entscheidend zum Isoleucinexport beiträgt.

Tab. 8: Isoleucinexportraten in Abhängigkeit der Expression von *brnFE* in *C. glutamicum*.

<i>C. glutamicum</i>	Exportrate für L-Isoleucin ^a
	[nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Tg]
13032/ pZ1	4,2 ± 0,4
13032Δ <i>brnFE</i> / pJC1	0,4 ± 0,2
13032/ pJC1 <i>brnFE</i>	7,8 ± 1,3

^a Die Werte dieser Berechnung sind als Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen mit ihrer Standardabweichung angegeben.

2.4 Physiologische Untersuchungen zum heterodimeren Aufbau des Exporters BrnFE

Nur für wenige sekundär aktive Transporter ist durch physiologischen Messungen eine heterodimere Struktur bestätigt (Masaoka *et al.*, 2000; Schaffitzel *et al.*, 1998). Im Fall von BrnFE wurde gezeigt, dass Unterbrechung des *brnF*-Gens durch Tn5531 in *C. glutamicum* 14752 zur Peptidsensitivität führt und die Überexpression von *brnF* in 13032Δ*brnFE* diese nicht wieder aufhebt. Obwohl, wie in Abb. 7 dargestellt, das *brnE*-Gen einen eigenen Promotor besitzt, trägt das entstehende Transkript vermutlich nicht zur Peptidbildung bei. Es ist wahrscheinlicher, dass *brnF* und *brnE* als Operon transkribiert werden. Damit ist zumindest formal möglich, dass der Isoleucinexport allein durch BrnE vermittelt wird, da in den bisherigen Konstruktionen die *brnE* Expression nicht gewährleistet ist.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde eine *in-frame* Deletionsmutante von *brnF* hergestellt, in der die *brnE*-Expression unbeeinträchtigt sein sollte. Die Herstellung des *brnF*-Deletionskonstruktes wurde analog zum Δ*brnFE*-Konstrukt durchgeführt, wobei das gleiche stromaufwärts gelegene Fragment, das durch die Primerkombination Primer A und Primer D in der PCR erhalten wurde, verwendet wurde und mit Primer E und Primer F ein 374 bp Fragment stromabwärts von *brnF* amplifiziert wurde. Das durch *cross-over* PCR entstandene ca. 700 bp Fragment wurde in die *EcoRI*/ *XbaI* site von pK19*mobsacB* kloniert. Durch die Sequenzierung des Inserts von pK19*mobsacB*Δ*brnF* wurde eine 100 %ige Über-

einstimmung mit der theoretischen Sequenz festgestellt. Um die Integration des Vektors in das Chromosom von *C. glutamicum* 13032 zu erreichen, wurde pK19*mobsacB*Δ*brnF* in *C. glutamicum* 13032 durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock eingebracht. Durch Selektion auf die von pK19*mobsacB* vermittelte Kanamycinresistenz konnte in fünf Ansätzen ein Klon erhalten werden, der ebenfalls die durch den Vektor vermittelte Saccharose-sensitivität besaß. Durch Kultivierung von *C. glutamicum* *brnF*::-pK19*mobsacB*Δ*brnF* ohne Selektionsdruck wurde eine zweite Rekombination ermöglicht, wodurch der Stamm 13032Δ*brnF* erhalten wurde. Durch PCR-Analyse mit den außerhalb des Deletionskonstruktes hybridisierenden Primern *lrp*-upper und *brnE*-lower konnte die Deletion nachgewiesen werden (Abb. 43, siehe Anhang). Zur Komplementation wurde in diesen Stamm das Plasmid pJC1*brnF* eingebracht und der Export von Isoleucin untersucht (Tab. 9).

Tab. 9: Exportraten von L-Isoleucin in Abhängigkeit der Expression von *brnF* und *brnE* in *C. glutamicum* zur physiologischen Untersuchung des heterodimeren Aufbaus von BrnFE.

<i>C. glutamicum</i>	Exportrate für L-Isoleucin
	[nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Tg]
13032Δ <i>brnFE</i> /pJC1 <i>brnFE</i>	6,9
13032Δ <i>brnFE</i> /pZ1 <i>brnE</i>	0,5; 0,3 ^b
13032Δ <i>brnFE</i> /pJC1 <i>brnF</i>	0,4; 0,2 ^b
13032 /pZ1 <i>brnF</i>	4,6
13032 /pJC1 <i>brnE</i>	3,7
13032Δ <i>brnF</i> /pJC1	-0,9 ± 0,6 ^a
13032Δ <i>brnF</i> /pJC1 <i>brnF</i>	4,8

^a Die Werte dieser Berechnung sind als Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen mit Standardabweichung angegeben.

^b Die Werte wurden in einer Doppelbestimmung erhalten.

Es zeigte sich, dass durch Überexpression der Einzelgene *brnF* oder *brnE* im Wildtyp die Exportrate nicht erhöht war, was darauf hinweist, dass die Einzelgene den Export von Isoleucin nicht katalysieren können. Der Export von Isoleucin konnte auch nicht durch die Überexpression der Einzelgene im *brnFE*-Deletionsstamm wiederhergestellt werden. Dies steht mit dem Ergebnis im Einklang, dass in Wachstumsexperimenten die Peptidsensitivität der *brnFE*-Deletionsmutante durch Überexpression die einzelnen Gene nicht aufgehoben werden konnte (Abb.

9). Auch in der *in-frame brnF*-Deletionsmutante, in der die Expression von *brnE* nicht beeinträchtigt sein sollte, konnte kein Export von L-Isoleucin nachgewiesen werden. Daraus ist zu schließen, dass *brnF* für den Export essentiell ist. Durch Überexpression von *brnF* durch pJC1*brnF* konnte eine Komplementation des Isoleucinexportes im Stamm *C. glutamicum* 13032 Δ *brnF* erreicht wird. Diese Komplementation des Exportes durch pJC1*brnF* ist nicht in der *brnFE*-Deletion möglich, da hier keine Kopie von *brnE* vorhanden war. Damit ist gezeigt, dass das Vorhandensein von *brnE*, wie auch das von *brnF*, essentiell für den Export von L-Isoleucin ist und somit BrnF und BrnE gemeinsam den Export katalysieren.

2.5 Untersuchungen zur Spezifität des Exportes

Da L-Leucin und L-Valin ebenfalls zu den verzweigtkettigen Aminosäuren gehören, könnten diese ebenfalls Substrat von BrnFE sein. Bereits in früher beschriebenen Experimenten wurde eine Reduzierung der Isoleucinexportrate bis zu 25 % beobachtet, wenn die interne Leucin- oder Valinkonzentration stark erhöht war (Hermann & Krämer, 1996). Da dies durch Konkurrenz der Aminosäuren um die freien Bindestellen des Exporters erklärbar wäre, kann eine Beteiligung dieser Aminosäuren am Export vermutet werden. Um nun zu untersuchen, ob Valin und Leucin ebenfalls durch den identifizierten Carrier BrnFE exportiert werden, wurden die Exportraten für diese Aminosäuren in definierten Stämmen bestimmt.

Um zu prüfen, ob L-Valin durch BrnFE transportiert wird, wurde die Exportrate unter Zugabe von 5 mM Alanyl-Valin bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die *brnFE*-Deletionsmutante intern bis zu 82 mM Valin akkumulierte, während 13032 Δ *brnFE*/pJC1*brnFE* nur ca. 30 mM anhäufte (Abb. 13A). Der reduzierte aktive Export in der *brnFE*-Deletionsmutante wird hier bereits durch den verringerten Gesamtefflux deutlich. Dies könnte die Folge der geringeren Membranpermeabilität für Valin sein (Milner *et al.*, 1987) was durch den Vergleich der Effluxraten des Deletionsstammes für Isoleucin und Valin bestätigt wird. Bei vergleichbarer interner Konzentration beider Aminosäuren ist der Efflux für Valin geringer als für Isoleucin, was auch eine geringere Diffusion bedeutet.

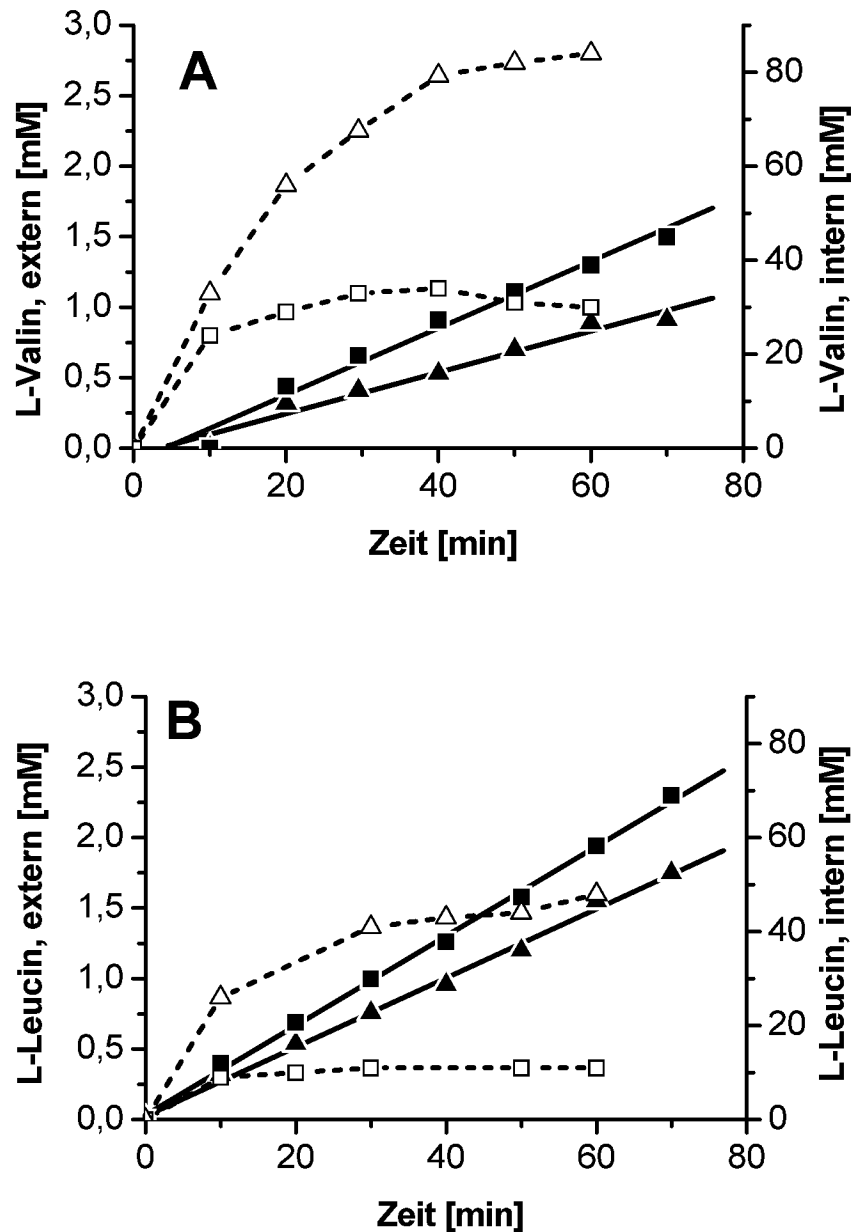


Abb. 13: Untersuchung zur Spezifität des Exporter BrnFE durch Exportratentests mit den Stämme 13032Δ*brnFE* / pJC1 (▲) und 13032Δ*brnFE* / pJC1*brnFE* (■). A: Interne Valinkonzentration (offene Symbole) und Efflux (geschlossene Symbole) nach Zugabe von 5 mM Alanyl-Valin. B: Interne Leucinkonzentration (offene Symbole) und Efflux (geschlossene Symbole) nach Zugabe von 5 mM Leucyl-Leucin.

Unter Verwendung der Diffusionskonstante von $0,09 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Millner, 1987; Krämer, 1994) beträgt die aktive Exportrate für Valin in der Deletionsmutante im Mittelwert $-0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und $4,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ im gleichen Stamm der

pJC1*brnFE* enthält (Tab. 10). Dies zeigt, dass der Export von Valin durch den von *brnFE* kodierten Exporter vermittelt wird. Darüberhinaus wurde eine Exportrate von 3,3 nmol min⁻¹ mg⁻¹ erhalten, wenn pJC1*brnFE* im Wildtyp eingebracht war. Da im Wildtyp eine Exportrate von 2,4 nmol min⁻¹ mg⁻¹ bestimmt wurde, wird der Export durch *brnFE*-Überexpression nur leicht gesteigert. Im Vergleich zum Export von Isoleucin ist die Valinexportrate um etwa 50 % geringer, was darauf hindeutet, dass Isoleucin bevorzugt transportiert wird.

Tab. 10: Exportrate für L-Valin nach Zugabe von 5 mM Alanyl-Valin bei *C. glutamicum* mit verschiedener Expression von *brnFE*.

<i>C. glutamicum</i>	Exportrate für L-Valin [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Tg]
13032/ pZ1	2,4; 2,0 ^b
13032Δ <i>brnFE</i> / pJC1	- 0,1 ± 0,9 ^a
13032Δ <i>brnFE</i> /pJC1 <i>brnFE</i>	4,5
13032/ pJC1 <i>brnFE</i>	3,3; 3,2 ^b

^a Die Werte dieser Berechnung sind als Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen mit Standardabweichung angegeben.

^b Die Werte wurden in einer Doppelbestimmung erhalten.

Interessanterweise wird im *brnFE*-überexprimierenden Stamm unter Verwendung Leucin-haltiger Peptide eine interne Leucinkonzentration von 15 mM nicht überschritten. Trotzdem wird mit 5 mM Leucyl-Leucin eine hohe Effluxrate von 8,6 nmol min⁻¹ mg⁻¹ erreicht (Abb. 13B). Die Exportraten für den überexprimierenden Stamm betragen 8,1 nmol min⁻¹ mg⁻¹ und sie ist nahe Null bei der Deletionsmutante (Tab. 11), was bedeutet, dass Leucin ebenfalls Substrat von BrnFE ist. Aufgrund dieser Exportraten ist anzunehmen, dass Leucin und Isoleucin mit vergleichbarer Rate exportiert werden.

Tab. 11: Exportrate für L-Leucin nach Zugabe von 5 mM Leucyl-Leucin bei *C. glutamicum* mit verschiedener Expression von *brnFE*.

<i>C. glutamicum</i>	Exportrate für L-Leucin [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Tg]
13032/ pZ1	4,0
13032Δ <i>brnFE</i> / pJC1	0,6 ± 0,4
13032Δ <i>brnFE</i> /pJC1 <i>brnFE</i>	8,1
13032/ pJC1 <i>brnFE</i>	6,3

Um dies zu bestätigen, wurde zusätzlich ein Konkurrenzexperiment durchgeführt, bei dem beide Aminosäuren gleichzeitig als Substrat für den Exporter zur Verfügung stehen. Zu diesem Zweck wurde das Dipeptid Leucyl-Isoleucin in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt.

Trotz vergleichbar geringer Aminosäurekonzentration von ungefähr 10 mM intern, was durch limitierte Peptidaufnahme bedingt sein könnte (Zittrich & Krämer, 1994), wurden vergleichbare Exportraten von $1,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für Leucin und $2,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ für Isoleucin ermittelt (Tab. 12). Dies bestätigt, dass der Exporter nicht zwischen diesen beiden hydrophoben Aminosäuren differenziert. Im Gegensatz zu den beim Wildtyp ermittelten Exportraten (Tab. 11) könnte die geringere Exportrate im letzten Experiment dadurch zu erklären sein, dass der Exporter möglicherweise nicht gesättigt ist. Dies steht im Einklang mit der vermuteten geringen Affinität des Systems (apparenter K_M : 21 mM; Zittrich & Krämer, 1994). Es legt somit eine vergleichbare Affinität des Systems für diese beiden Aminosäuren nahe.

Tab. 12: Exportraten für Leucin und Isoleucin in einem Konkurrenzexperiment mit 10 mM Leucyl-Isoleucin bei *C. glutamicum* 13032/ pZ1.

<i>C. glutamicum</i>	Leucinexportrate	Isoleucinexportrate
	[nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Tg]	
13032/ pZ1	1,8	2,3

2.6 Bedeutung des putativen Regulators Lrp für den Isoleucinexport

Das Gen des putativen Regulators Lrp liegt stromaufwärts von *brnF* (Abb. 7). Um herauszufinden, ob Lrp an der Regulation des Exporters beteiligt ist, wurde zunächst eine Inaktivierungsmutante hergestellt. Dazu wurde aus dem Vektor pUC18Klon1-8EcoRI ein 203 bp großes *Bst*EII und *Bgl*II internes Fragment von *lrp* isoliert und nach Klenow-Behandlung in die *Sma*I-site von pK18mob kloniert. Nach Einbringen des Plasmides in *C. glutamicum* 13032 konnten durch Selektion auf die durch den Vektor vermittelte Kanamycinresistenz, Integrationsmutanten erhalten werden. Durch PCR-Analysen mit dem vektoriellen Primer RSP und dem chromosomalen Primer *lrp*-upper konnte die Unterbrechung des Gens nach

400 bp bestätigt werden. Um den Einfluss einer *lrp*-Überexpression untersuchen zu können, wurde das *lrp*-Gen in einer PCR mit den Primern *lrp*-upper und *lrp*-lower als 0,65 kb großes Fragment amplifiziert und zunächst in die *Sma*I-site von pUC18 kloniert. Ein aus diesem Vektor isoliertes *Eco*RI/ *Xba*I Fragment wurde über stumpfe Enden mit pZ1 ligiert. Zur Überexpression wurden das Plasmid in *C. glutamicum* 13032 eingebracht.

Die Exportrate für L-Isoleucin wurde nun in dem *lrp*-Inaktivierungsstamm 13032::pK18*moblrp_{int}* bestimmt. Dabei zeigte sich eine Reduzierung der Isoleucinexportrate auf 0,7 nmol min⁻¹ mg⁻¹ in diesem Stamm, was auch mit einer *lrp*-Deletionsmutante, die freundlicherweise von Mirja Wessel⁶ zur Verfügung gestellt wurde, bestätigt werden konnte (Tab. 13). Dies deutet daraufhin, dass Lrp essentiell für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren ist und wahrscheinlich als transkriptioneller Regulator die *brnFE*-Expression aktiviert. Die Überexpression von *lrp* durch das *multi-copy* Plasmid pZ1 in *C. glutamicum* 13032 ergab hingegen keine Erhöhung der Exportrate (Tab. 13). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass unter den verwendeten Bedingungen der Regulator die Expression von *brnFE* bereits maximal induziert hat.

Tab. 13: Untersuchung zum Einfluss des Regulators Lrp auf die Isoleucinexportrate in *C. glutamicum* mit 3 mM Isoleucyl-Isoleucin.

<i>C. glutamicum</i>	Exportrate für L-Isoleucin
	[nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Tg]
13032 /pZ1 <i>lrp</i>	3,6
13032Δ <i>lrp</i> /pZ1	0,0; -0,7
13032 <i>lrp</i> ::pK18 <i>moblrp_{int}</i>	0,7

3 Identifizierung der LIV-E Familie der Transporter

3.1 Phylogenetische Analysen

Um zu untersuchen, ob zu BrnF und BrnE homologe Proteine auch in anderen Organismen vorhanden sind, wurden Datenbankanalysen durchgeführt. Dabei konnten durch das PSI-BLAST Programm (Altschul *et al.*, 1997) des NCBI's

⁶ Arbeitsgruppe M. Bott, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich

(*national center of biotechnology information*) in einer ganzen Reihe von Organismen homologe Proteine identifiziert werden. Dabei wurde festgestellt, dass mit wenigen Ausnahmen die Genanordnung identisch ist, mit *brnF* stromaufwärts von *brnE*. Die Proteine wurden zur LIV-E Familie der Transporter zusammengefasst, wobei diese Abkürzung für Leucin-, Isoleucin- und Valinexport steht. In Tab. 14 sind die zu BrnF (links) und BrnE (rechts) homologen Proteine, sowie deren Größen in Aminosäuren aufgelistet. Das Vorkommen des LIV-E Systems ist auf prokaryotische Organismen beschränkt, wobei Gram positive und Gram negative Bakterien genauso vertreten sind wie Archaea. Das Genom der meisten dieser Mikroorganismen kodiert das LIV-E System einmal. Im Genom der α - und β -Proteobakterien (Atu, Mlo, Sme, bzw. Rso) sowie des Gram positiven *C. glutamicum* (Cgl) werden bis zu drei paraloge Systeme kodiert. Erstaunlicherweise enthält das Genom des mit *C. glutamicum* eng verwandten *C. diphtheriae* lediglich eine Kopie der Gene. Diese Gram positiven Mikroorganismen gehören zur Unterordnung der *Corynebacterineae* innerhalb der Ordnung der *Actinomycetales* (Stackerbrandt *et al.*, 1997). Zur gleichen Unterordnung zählt die Familie der *Mycobacteriaceae*. Dennoch sind diese Gene in den Organismen *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis* und *M. smegmatis* nicht vorhanden.

Tab. 14: Sequenzierte Proteine der verzweigtkettigen Aminosäure Exporter der LIV-E-Familie

Abbkürzung	Organismus	BrnF Homologe		BrnE Homologe	
		Größe (As) ^a	GI-Nummer ^b	Größe (As) ^a	GI-Nummer ^b
Atu1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	240	15157197	104	15157198
Atu2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	234	15156113	100	15156114
Atu3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	275	15156429	114	15156430
Afu	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	219	11499344	100	11499343
Bha	<i>Bacillus halodurans</i>	237	10175532	102	10175533
Bsu	<i>Bacillus subtilis</i>	254	3121821	110	3121820
Dra	<i>Deinococcus radiodurans</i>	235	7471172	98	7473007
Dgi	<i>Desulfovibrio gigas</i> ^c	235	12802727	103	
Cgl1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	251	14273894	108	14273895
Cgl2	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	237	19554272	115	19554271
Cph	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	243	RDI01680 ^f	125	RDI01681 ^f
Eco	<i>Escherichia coli</i>	245	3123142	111	2506710
Hin	<i>Haemophilus influenzae</i>	244	1176150	109	1176149
Hpy-A	<i>Helicobacter pylori</i> (J99)	228	12230844	118	11387375
Hpy-B	<i>Helicobacter pylori</i>	228	3123102	115	3123101
Lla	<i>Lactococcus lactis</i>	235	12724620	108	12724619
Mlo1	<i>Mesorhizobium loti</i>	242	13471536	98	13471535
Mlo2	<i>Mesorhizobium loti</i>	244	13472209	99	13472208
Mja	<i>Methanococcus jannaschii</i> ^d	73	3219930	110	3219926
Mma	<i>Methanosarcina mazei</i>	244	21229364	112	21229365
Nme	<i>Neisseria meningitidis</i> ^e	160	11353336		

Tab. 15 (ff): Sequenzierte Proteine der verzweigt-kettigen Aminosäure Exporter der LIV-E-Familie

Pmu	<i>Pasteurella multocida</i>	240	12720674	109	12720675
Pch	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	247	14970542	113	14970543
Pae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	252	11349405	104	11349404
Rsp	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ^c	235	7657933		
Rso1	<i>Ralstonia solanacearum</i>	242	17545232	108	17545231
Rso2	<i>Ralstonia solanacearum</i>	250	17549595	100	17549594
Sme1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	238	15075182	102	15075181
Sme2	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	256	15074061	100	15074062
Sme3	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	248	15074421	111	15074422
Sau	<i>Staphylococcus aureus</i>	231	13699927	109	13699928
Spn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	218	14971611	107	14971612
Scs	<i>Streptomyces coelicolor</i>	256	7479559	102	7479560
Vch	<i>Vibrio cholerae</i>	239	11354432	105	11355554
Ype	<i>Yersinia pestis</i>	257	16123421	113	16123422

^a Die Größe der Proteine der LIV-E Familie ist in Aminosäuren angegeben

^b GI, GenInfo Identifier (Eintrag in der GenBank).

^c Ein zu BrnE homologes Protein konnte in der Datenbank nicht gefunden werden, allerdings ist die vollständige Genomsequenz zum Zeitpunkt der Analysen noch nicht zugänglich.

^d Die geringe Größe des BrnF-Homologen aus *M. jannaschii* ist auf eine genomische Deletion zurückzuführen. Falls diese Deletion nicht auf einem Sequenzierungsfehler zurückzuführen ist, wäre dieses verkürzte BrnF-Homologes wohl nicht funktionell.

^e Beide Stämme von *Neisseria meningitidis* (serogroup A strain Z2491 and serogroup B strain MC58) besitzen ein nur verkürztes BrnF-Homologes und kein BrnE-Homologes. Da dies vermutlich auf natürliche genomische Deletion zurückzuführen ist, handelt es sich hier vermutlich um nicht-funktionelle Pseudogene.

^f Accessionnummer wurde der ERGO-Datenbank entnommen.

Aus den Daten, die in Tab. 14 aufgelistet sind, kann zusammengefaßt werden, dass die meisten BrnF Homologen aus 218-256 Aminosäureresten bestehen, während alle BrnE Homologe 98-118 Aminosäurereste haben. Die in *M. jannaschii* und *N. meningitidis* identifizierten BrnF Homologen sind jedoch verkürzt. Da in *N. meningitidis* auch kein zu BrnE homologes Protein vorhanden ist, ist davon auszugehen, dass beide Organismen keinen funktionellen Transporter ausbilden und es sich somit um Pseudogene handelt. Diese teilweise oder auch, wie in den *Mycobacteriaceae* komplette Reduktion des LIV-E Systems deutet auf eine nicht essentielle Funktion dieser Transportsysteme hin. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass es möglich ist, *brnFE* in *C. glutamicum* (Cgl1) und *azlCD* (Bsu) in *B. subtilis* (Belitsky *et al.*, 1997) zu inaktivieren.

Um die Verwandtschaft zwischen den Proteinen der LIV-E-Familie zu untersuchen wurden phylogenetische Stammbäume erarbeitet. Dazu wurden alle Sequenzen aus den Datenbanken zusammengetragen und zunächst ein multiples Sequenzalignment mit dem ClustalX Programm (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt. Darauf aufbauend wurde der phylogenetische Stammbaum, der auf einer Blossum 30 Matrix beruht, ermittelt. Beide Programme stehen auf der Internetseite <http://saier-144-37.ucsd.edu/biotools/> zur Verfügung und die dabei erhaltenen Stammbäume von BrnF und BrnE sind in Abb. 14 dargestellt. Entsprechend der Sequenzähnlichkeit fallen die Proteine der verschiedenen Organismen in Gruppen, sogenannten Clustern, zusammen. Diese Cluster sind zwischen dem BrnF- und BrnE-Stammbaum weitestgehend identisch. Die Homologen der Gram positiven Bakterien fallen in drei Gruppen. Zu diesen gehören die Gram positiven mit hohem G+C Gehalt (Sco, Cgl1, Cgl2 und Cph in Gruppe 6), die Gruppe der Gram positiven mit niedrigem G+C Gehalt (Spn, Lla und Sau in Gruppe 4) und etwas aus dem Rahmen fällt *B. halodurans* (Bha). In anderen Gruppen fällt eine gewisse Durchmischung auf. So fallen beispielsweise die Proteine des zu den Archaea gehörenden *A. fulgidus* mit denen des zu den γ 1-Proteobakterien gehörenden Proteinen von *E. coli* zusammen in die Gruppe 2. Außerdem sind mehrere Organismenklassen in Gruppe 5 vertreten. Neben den Proteinen der γ 2-Proteobakterien (Hin und Pmu) findet sich auch jeweils ein Protein des ϵ -Proteobakterien (Hpy), der Gram positiven mit niedrigem G+C-Gehalt (Bsu) und sogar

der Archaea (Mma). Dieser Umstand deutet stark darauf hin, dass diese Gene durch horizontalen Gentransfer zwischen den Mikroorganismen verschiedener Klassen ausgetauscht worden sind. So ist für das zu den Archaea gehörende *Methanosarcina mazei* bekannt, dass knapp 1/3 der Gene, bakteriellen Ursprungs sind (Deppenmeier *et al.*, 2002). Da dieses Archaeobakterium in Assoziation mit fermentativen Eubakterien lebt und sich von dessen Ausscheidungsprodukten ernährt, ist ein horizontaler Gentransfer möglich.

Wie bereits erwähnt, wurden bei einigen Organismen paraloge Systeme identifiziert. Es zeigte sich, dass diese paralogen Proteine eines Organismus eine geringere Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen, als zu den orthologen Systemen der engverwandten Organismen. So zeigt auch das paraloge System aus *C. glutamicum* (Cgl2) eine geringere Ähnlichkeit zum charakterisierten BrnFE (Cgl1), als zum orthologen System aus *C. diphtheriae* (Cph), was durch den phylogenetischen Stammbaum deutlich wird. Auch die orthologen Systeme der α - und β -Proteobakterien fallen aufgrund höherer Sequenzidentitäten in drei verschiedene Gruppen. Dabei ist die Sequenzähnlichkeit der paralogen Systeme eines Organismus geringer, als zu den Orthologen der verwandten Organismen. So clustert z.B. Sme3 zusammen mit Atu3 in Gruppe 8. Dies könnte bedeuten, dass Genduplikationen, aus denen die paralogen Systeme hervorgegangen sind, bereits vor der Entstehung der Gattungen stattgefunden haben könnten und im Laufe der Evolution eine Differenzierung der Systeme erfolgte. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch die Substratspezifität dieser potentiellen Transportsysteme im Laufe der Evolution eine Differenzierung erfahren hat. Die funktionelle Charakterisierung von BrnFE in *C. glutamicum* lässt vermuten, dass grundsätzlich hydrophobe Substanzen mit geringem Molekulargewicht transportiert werden.

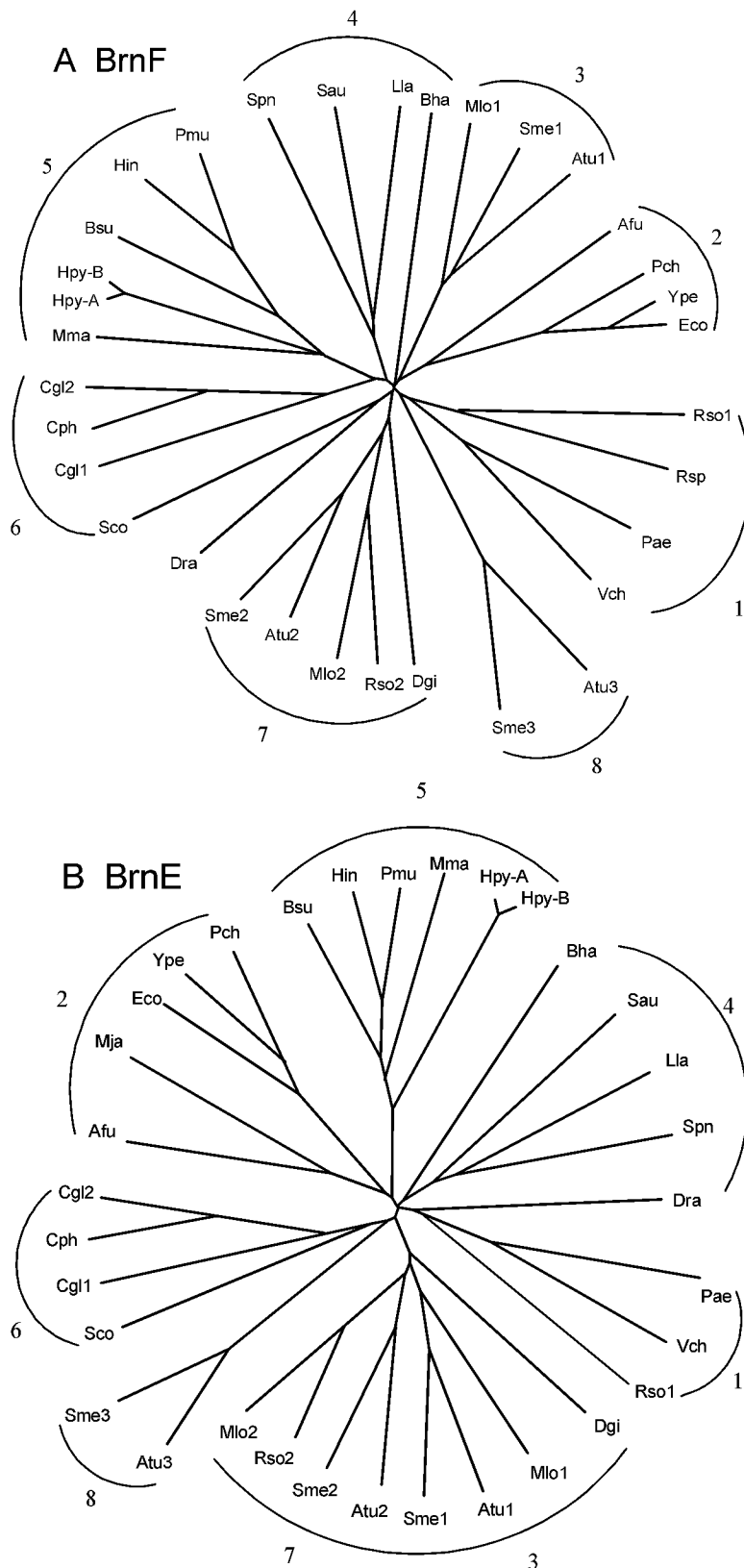


Abb. 14: Phylogenetische Stammbäume der (A) BrnF- und (B) BrnE-Homologen. Die Abkürzungen zur Bezeichnung der Organismen sind in Tab. 8 angegeben. Die Astlängen geben die evolutionsmäßige Distanz zwischen den Homologen an.

3.2 Untersuchungen zum paralogen *brnFE*-System in *C. glutamicum*

Das bereits erwähnte paraloge LIV-E System in *C. glutamicum* wurde im Zuge der Genomsequenzierung identifiziert (Tab. 14). Da aufgrund der Sequenzidentitäten eine ähnliche Funktion der beiden LIV-E Systeme in *C. glutamicum* vermutet wurde, wurde dieses Paraloge mit BrnFE-2 bezeichnet und eine Charakterisierung vorgenommen.

3.2.1 Sequenzanalyse

Zur weiteren Untersuchung wurde zunächst eine Sequenzanalyse durchgeführt. Dabei wurde die Sequenz von BrnFE-2 mit der Sequenz des bereits charakterisierten Exporters BrnFE-1 verglichen Abb. 15. Es zeigte sich, dass die Identitäten der von *brnF* abgeleiteten Proteine 40 % betragen, wohingegen die beiden von *brnE* abgeleiteten Proteine zu 34 % identisch sind.

BrnF1	1	VQKTQEIHSSEVSPSKAALEPDDKGYRRYETIAQGIKTSIAAGLGMYPIC
BrnF2	1	-----MSENLEIRGGIGETITVGLGLIPLG
Consensus	1	** * . *. ***. *. *
BrnF1	51	IAFGLLVIQYGEWAAFLFSGLIFAGSTEMLVIALVGAAPLGAIATTT
BrnF2	28	IAFGLLMVQTGFVWWTFIFSFVIYAGSMFLAIGMVTAGIGPFSAAVAG
Consensus	51	.*****. * . * . * . * . * . * . * . * . *
BrnF1	101	LVNFRHVFYAFSFPPLHVKNPIAREYSVFALIDEAYAVTAARPAC-WSA
BrnF2	78	LVNFRHVFYGLTFPRHRKSGAGRAYSTVALTDESAYIVSARPPGDISG
Consensus	101	.*****. * . * . * . * . * . * . * . * . *
BrnF1	150	WRLISMQIAFHSYWVFGGLTGVAIAELIPFEIKGLEFALCSLFVTITLDS
BrnF2	128	TRVLTVOILCQALWVIPGLIGALVGQVLPDDLKGMDFALTALFVVLAWEA
Consensus	151	*.....** * . * . * . * . * . * . * . *
BrnF1	200	CRTKKQIPSLLLAGLSFTIALVVIPEGCALFAALLIELGLTIRYFELGKA
BrnF2	178	FKNNKDYSLEPLFAVVLALVSGFVAPEOMLVIALTTTYFLILLRVREPILD
Consensus	201	. * . * . * . * . * . * . * . *

BrnF1	250	AK-----
BrnF2	228	KKLEIRTSHE
Consensus	251	*

BrnE1	1	-----MTTDFSCILLVVAVCAVITFALRAVPFLILKPLRESQFVGKMA
BrnE2	1	MSEFGLPEGVTLLNVAAVLIPIAIIITLLLRIFPFAAMKRVNSNOLMGVLG
Consensus	1	. *. *.** ** ** .* . * .* ..

BrnE1	44	MWMPAGILATLTASTFRSNAIDLKTLTFGLIAVAITVVAHLGGRRTLLS
BrnE2	51	RTMPVGVMVVLVIYTLFGQVSAPGGVGASTIAVAFTALLEWIKC-SAGLS
Consensus	51	** *.. * * . . ***** * . * * *. **

BrnE1	94	VGAGTIVFVGLVNLF-
BrnE2	100	IVGGTLAYMFLVNVVF
Consensus	101	. .**.. .. ***.

Abb. 15: Alignment der beiden paralogen BrnFE-Systeme aus *C. glutamicum*. Schwarz unterlegte Bereiche zeigen identische Aminosäuren, grau unterlegte ähnliche.

Die relativ hohe Sequenzidentität zwischen den paralogen Systemen in *C. glutamicum* deutet auf eine vergleichbare Funktion hin. Dennoch zeigt der phylogenetische Stammbaum, dass eine höhere Verwandtschaft zum LIV-E System aus *C. diphtheriae* vorliegt, obwohl hier alle Proteine in die selbe Gruppe fallen (siehe Abb. 14, Kap. 3.1). In Abb. 16 ist die Genumgebung von *brnFE-2* dargestellt. Stromaufwärts zu *brnF-2*, ist das Gen eines möglichen Regulators lokalisiert, dessen abgeleitetes Protein zu 27 % zu AlgH aus *Pseudomonas aeruginosa* identisch ist, der dort an der Regulation von Virulenzfaktoren beteiligt ist (Schlichtmann *et al.*, 1995). Da *algH* direkt an *brnF-2* grenzt, ist eine Operonstruktur möglich. Auch das zu *algH* stromaufwärts gelegene hypothetische *pcnA*-Gen (55 %ige Identität des Genproduktes zu einer Poly-A-Polymerase aus *S. coelicolor*, Bralley *et al.*, 2001) könnte diesem Operon angehören. Daher könnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen den Genprodukten AlgH, PcnA und BrnFE-2 vermutete werden. Da aber keines der Gene in *C. glutamicum* charakterisiert ist, kann nicht auf ein mögliches Substrat von BrnFE-2 ge-

geschlossen werden. Stromabwärts zu *brnE-2* ist in entgegengesetzter Leserichtung das Gen eines möglichen Kupferbindeproteins (*copP*) lokalisiert. Der Abstand von 80 bp zu *brnE-2* macht einen funktionellen Zusammenhang unwahrscheinlich. Da festgestellt wurde, dass eine *brnFE-1*-Deletionsmutante nicht mehr in der Lage ist Isoleucin zu exportieren, kann Isoleucin auch kein Substrat von BrnFE-2 sein. Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten wiederum ist es wahrscheinlich, dass das paraloge System Substanzen transportiert, die vergleichbare chemische Eigenschaften wie die verzweigt-kettigen Aminosäuren haben, also klein und hydrophob sind.

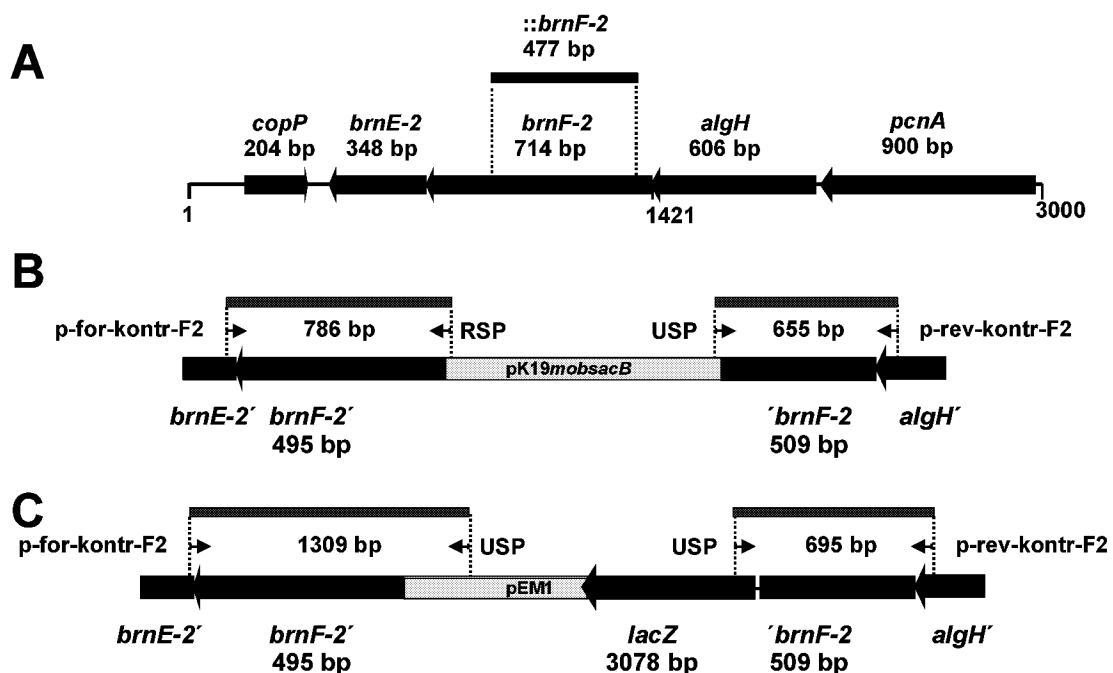


Abb. 16: Genanordnung und Klonierungsübersicht zu dem paralogen System *brnFE-2*. A: Die Pfeile geben die Gene mit ihrer Größe in bp an. Der darüber liegende Balken beschreibt den Teil der zur Inaktivierung von *brnF-2* durch PCR amplifiziert wurde und anschließend in *pK19mobsacB*, bzw. *pEM1* kloniert wurde. B: Zustand nach Integration von *pK19mobsacB::brnF-2_{int}* in das Chromosom von *C. glutamicum* 13032. Die Balken oberhalb der Gene zeigen die in der analytischen PCR amplifizierten Fragmente mit ihrer Größe in bp und den Primern (dünne Pfeile). Die kursiv abgebildeten Gennamen sind mit einem (') markiert, wenn nur noch verkürzte Fragmente vorliegen. C: Zustand nach Integration von *pEM1::brnF-2-lacZ* in das Genom von *C. glutamicum*. Die Balken oberhalb der Gene zeigen die in der analytischen PCR amplifizierten Fragmente mit ihrer Größe in bp und den Primern (dünne Pfeile) an.

3.2.2 Konstruktion und Charakterisierung einer *brnF*-2-Inaktivierungsmutante

Um einen Zugang zur Funktion des BrnFE-2-Systems zu ermöglichen, sollte zunächst eine Inaktivierungsmutante des Systems hergestellt werden. Dazu wurde ein Inaktivierungskonstrukt hergestellt, indem mit den Primern upper_F2 und lower_F2 (siehe Tab. 19) ein 477 bp großes internes *brnF*-2 Fragment amplifiziert und anschließend in die *Sma*I-site des Vektors pK19*mobsacB* kloniert.

Das Insert des resultierenden Plasmides wurde, nach Überprüfung mittels Sequenzierung, in *C. glutamicum* Wildtyp Zellen sowie *C. glutamicum* Δ *brnFE* eingebracht (Abb. 16B). Je ein Klon wurde durch Kolonie-PCR auf Integration von pK19*mobsacBbrnF*-2_{int} überprüft. Durch Verwendung eines im Vektor liegenden Primers und eines außerhalb des Konstruktes liegendem Primer (RSP + p-for-kontrolle-F2, bzw. USP + p-rev-kontrolle-F2) konnte die chromosomale Unterbrechung von *brnF*-2 nach 509 bp bestätigt werden (Abb. 17). Die problemlose Inaktivierung des Gens lässt darauf schließen, dass dieses unter den verwendeten Kulturbedingungen nicht essentiell ist.

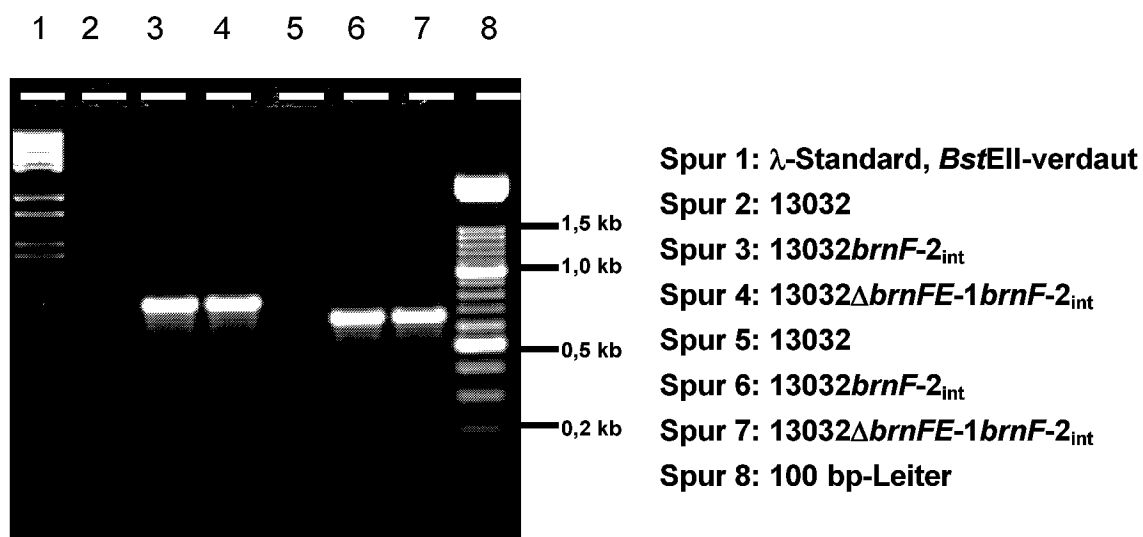


Abb. 17: 2 %iges Agarosegelfoto der PCR-Ansätze zum Nachweis der Integration von pK19*mobsacBbrnF*-2_{int} in *C. glutamicum* 13032 und 13032 Δ *brnFE*. In Spur 2-4 sind die Ansätze mit den Primern RSP und p-for-Kontr-F2 aufgetragen, wobei im Falle der Integration ein 0,79 kb großes Fragment entsteht. In Spur 3-5 sind die Ansätze mit den Primern USP und p-rev-kontr-F2 aufgetragen. Im Fall der Integration entsteht hier ein 0,66 kb Fragment.

Um zu untersuchen, ob die *brnF-2* Integration einen phänotypischen Effekt auf das Wachstum von *C. glutamicum* hat, wurden zunächst Wachstumskurven in CgXII-Minimalmedium und BHI-Komplexmedium durchgeführt (Abb. 18). Es zeigte sich, dass die *brnF-2*-Integrationsmutante vergleichbar wie der Wildtyp wuchs.

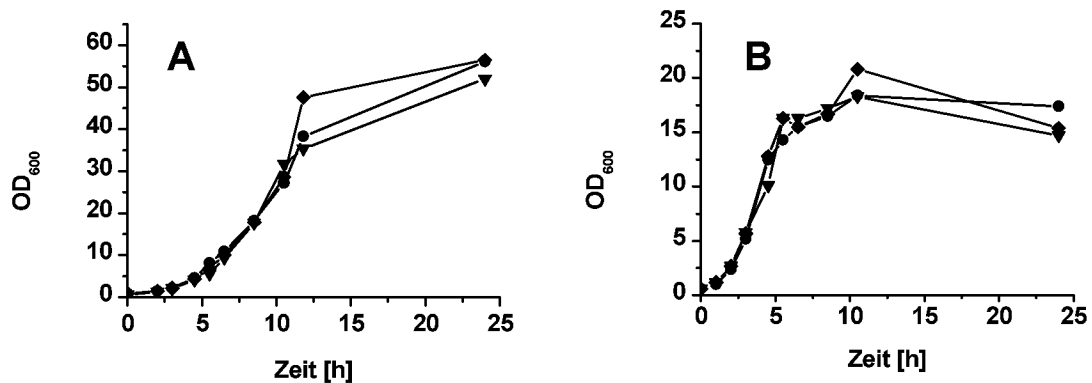


Abb. 18: Wachstum von 13032/ pZ1(◆), 13032Δ*brnFE-1*/ pJC1 (▼) und 13032::*brnF-2*_{int}(●) auf CgXII-Medium mit 4 % Glucose (A) und auf BHI-Vollmedium (B).

Um zu prüfen, ob in *brnF-2*-Inaktivierungsstämmen eine Peptidsensitivität vorliegt, wurde das Wachstum von 13032::*brnF-2*_{int} und 13032Δ*brnFE-1*::*brnF-2*_{int} im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen in CgXII-Minimalmedium mit Isoleucyl-Isoleucin bzw. Alanyl-Leucin untersucht (Abb. 19).

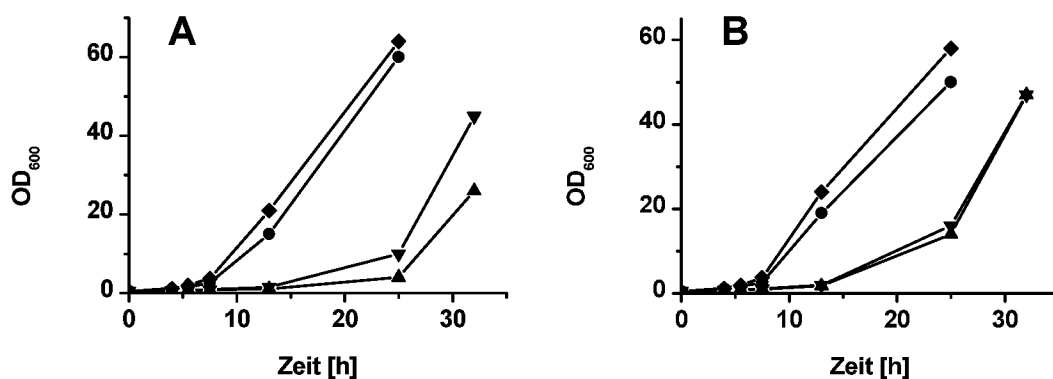


Abb. 19: Wachstum der *brnF-2*-Integrianten in Anwesenheit von 5 mM Isoleucyl-Isoleucin (A) bzw. 5 mM Alanyl-Leucin (B) im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen. (◆) 13032/ pZ1, (●) 13032::*brnF-2*_{int}, (▲) 13032Δ*brnFE-1*/ pJC1, (▼) 13032Δ*brnFE-1*::*brnF-2*_{int}.

Abb. 19 zeigt, dass sowohl 13032::*brnF-2*_{int} als auch 13032Δ*brnFE-1*::*brnF-2*_{int} ein vergleichbares Wachstum aufweisen wie die entsprechenden Ausgangsstämme. Da durch *brnF-2*-Inaktivierung keine Sensitivität gegenüber Isoleucyl-Isoleucin bzw. Alanyl-Leucin bedingt wurde, bestärkt dies die Vermutung, dass BrnFE-2 nicht am Export dieser Substanzen beteiligt ist. Da aufgrund hoher Sequenzidentitäten aber die Vermutung besteht, dass ein zu Isoleucin bzw. Leucin strukturanaloges Substrat exportiert werden könnte, wurden verschiedene Substanzen auf eine wachstumshemmende Wirkung überprüft (Tab. 16).

Tab. 16: OD₆₀₀ nach 13 h bei Wachstum von 13032/ pZ1, 13032Δ*brnFE-1*/ pJC1 und 13032::*brnF-2*_{int} auf CgXII mit 4 % Glucose und der angegebenen Konzentration an Substanz.

Stamm	13032/ pZ1	13032Δ <i>brnFE-1</i> / pJC1	13032:: <i>brnF-2</i> _{int}
CgXII	16.1	14.7	16.1
100 mM Isoleucin	12.2	3.8	14.4
100 mM Leucin	13.7	2.6	14.4
100 mM Valin	12.3	14.0	14.0
200 mM Threonin	13.4	10.6	13.8
0.5 mM Azaleucin	2.3	2.5	2.2
10 mM Liponsäure	8.4	7.8	8.7
200 mM Acetat	7.5	7.0	8.4
50 mM Propionat	5.7	3.4	5.3
50 mM Butyrat	8.9	8.6	7.7
10 mM Keto-β-Methylvalerat	5.7	3.4	5.3
50 mM Ketoisovalerat	4.6	4.0	5.4
10 mM Ketoisocaproat	5.8	2.4	4.4
50 mM Norleucin	6.6	4.0	5.8
10 mM Norvalin	7.0	3.5	7.5

Die *brnFE-1*-Deletionsmutante zeigte verringertes Wachstum in Gegenwart von Leucin und Isoleucin. Dies zeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, durch diesen

Test Hinweise auf Substrate eines Exporters zu erhalten. Das verringerte Wachstum der *brnFE-1*-Deletion in Anwesenheit der Vorstufen von Isoleucin und Leucin, Ketomethylvalerat und Ketoisocaproat, ist vermutlich durch eine Akkumulation der entsprechend daraus synthetisierten Aminosäuren zu erklären. Weiterhin wächst die *brnFE-1*-Deletionsmutante in Anwesenheit der toxischen Derivate Norleucin und Norvalin verzögert. Für Norleucin wurde bereits vermutet, dass der Transport durch den Isoleucinexporter vermittelt wird, da der Export von Isoleucin durch die externe Zugabe dieser Substanz gehemmt wird (Hermann & Krämer, 1996). Offensichtlich ist dies auch für Norvalin der Fall und damit ist wahrscheinlich, dass diese beiden Strukturanaloga als Substrat von BrnFE-1 akzeptiert werden.

Das Wachstum in Gegenwart organischer Säuren, sowie der Ketosäuren und den strukturanalogen Verbindungen war auch schon beim Wildtyp reduziert. Es zeigte sich bei keiner der Substanzen ein abweichendes Verhalten der *brnF-2*-Integrationsmutante im Vergleich zum Wildtyp, was es somit unwahrscheinlich macht, dass eine dieser Verbindungen als Substrat von BrnFE-2 transportiert wird.

3.2.3 Konstruktion eines *brnF-2-lacZ*-Fusionsstammes und Untersuchungen zur Expression

Da die Wachstumsexperimente keinen Hinweis zur Funktion des paralogen Systems ergaben und da aufgrund der genetischen Umgebung vermutet werden konnte, dass das System auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, wurden Untersuchungen zur Expression von *brnF-2* durchgeführt. Vorrausgesetzt, die von BrnFE-2 transportierte Substanz beeinflusst die Genexpression, wie es für einige sekundär aktive Transporter der Fall ist (Bellmann *et al.*, 2001, Dover *et al.*, 2001), wäre ein vereinfachtes Screening zur Identifizierung des Substrates möglich. Daher wurde eine transkriptionelle Fusion von *brnF-2* mit dem für die β -Galaktosidase kodierenden *lacZ*-Gen konstruiert und in einfacher Kopie in das Genom von *C. glutamicum* integriert.

Zur Herstellung des Konstruktes wurde zunächst aus dem Vektor pK19*mobsacB-brnF-2*_{int} ein internes *brnF-2*-*Xba*I-Fragment ausgeschnitten und in die *Xba*I-site des Vektors pEM1 (Schrumpf *et al.*, 1991) kloniert. Die Richtigkeit des Inserts von pEM1*brnF-2*_{int} wurde durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde ein ca. 3,4 kb großes *lacZ*-Fragment durch Restriktion mit *Xba*I und *Xmn*I aus dem

Plasmid p*WIT10* (von Wilcken-Bergmann, *et al.*, 1986) erhalten und in die *Sall*-Restriktionsschnittstelle von pEM1*brnF*-2_{int} kloniert. Durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung des klonierten *lacZ*-Gens mit den Primern 810-233 R1-R6 konnte das gewünschte Konstrukt bestätigt werden. Die Integration von pEM1*brnF*-2_{int}/*lacZ* erfolgte durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock (Abb. 16). Die chromosomale Integration in 13032::*brnF*-2-*lacZ* wurde an beiden dem Plasmid angrenzenden Seiten mit den Primern USP und p-for-kontr.-F2, bzw. USP und p-rev-kontr.-F2 nachgewiesen (Abb. 20).

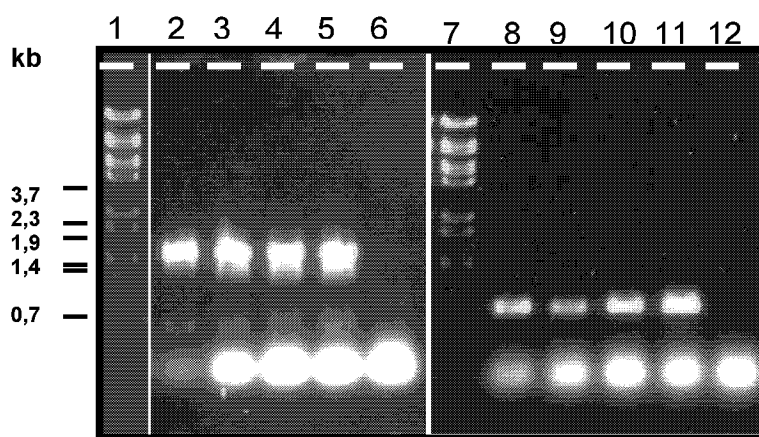


Abb. 20: 2 %iges Agarosegelfoto der PCR-Ansätze zum Nachweis der Integration von pEM1-*brnF*-2-*lacZ* in *C. glutamicum*. In Spur 2-6 sind die Ansätze mit den Primern USP + p-for-kontr.-F2 (1395 bp) aufgetragen. In Spur 8-12 sind die Ansätze mit den Primern USP und p-rev-kontr.-F2 aufgetragen (695 bp). Spur 2-5 bzw. 8-11 sind die Reaktionen mit jeweils vier Klonen *C. glutamicum* 13032::*pEM1-brnF*-2-*lacZ*, in Spur 6 und 12 ist die Reaktion mit dem Vektor aufgetragen. In den Spuren 1 und 7 ist jeweils λ -DNA *Bst*EI als Standard aufgetragen.

Zunächst wurde im Plattentest mit dem Stamm 13032::*brnF*-2-*lacZ* untersucht, ob die *brnF*-2-Expression in Anwesenheit verschiedener Aminosäuren verändert ist. Da die durch das *lacZ*-Gen kodierte β -Galaktosidase das Galaktosid XGal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosid) zu einem blauen Farbstoff umsetzt, ist die Intensität der Blaufärbung ein Maß der *lacZ*-Expression, die in dem verwendeten Fusionsstamm an die Expression von *brnF*-2 gekoppelt ist. Als Vergleichsstamm wurde der von Bellmann *et al.* (2001) publizierte Stamm *C. glutamicum* 13032 Δ *lysEG*::*lysGE-lacZ* verwendet. Der Wildtyp *C. glutamicum* 13032/ pZ1 zeigte bei Zusatz von XGal unter keiner Bedingung eine Blaufärbung.

Tab. 17: Test von *lacZ*-Fusionsstämmen auf unterschiedliche Expression in Anwesenheit verschiedener Aminosäuren im Plattentest mit XGal 60 µg/ml.

Blaufärbung nach 24 h	13032:: <i>brnF-2-lacZ</i>	13032 Δ <i>lysEG::lysGE-lacZ</i>
CgXII	+(+)	+(+)
BHI	+	++
CgXII + 100 mM Ile	+	+
CgXII + 100 mM Leu	+	+
CgXII + 100 mM Val	+	+(+)
CgXII + 100 mM Thr	+(+)	+
CgXII + 1 % Casein	+	+

(+), +, +(+), ++ gibt die relative Intensität der Blaufärbung von Einzelkolonien mit 60 µg/ml XGal nach 48 h an.

Tab. 17 zeigt, dass sowohl der Stamm *C. glutamicum* 13032::*brnF-2-lacZ*, als auch *C. glutamicum* 13032 Δ *lysEG::lysGE-lacZ* unter allen Bedingungen Blaufärbung mit 60 µg/ml XGal aufweist, was mit der Expression der Gene *brnF-2* und *lysE* korreliert. Dies bedeutet, dass *brnF-2* unter diesen Bedingungen exprimiert wird. Eine Erhöhung der Blaufärbung, und somit eine verstärkte *lacZ*-Expression, wurde nur bei *C. glutamicum* 13032 Δ *lysEG::lysGE-lacZ* bei Wachstum auf BHI-Komplexmedium im Vergleich zu CgXII-Minimalmedium beobachtet. Dieser qualitative Befund stimmt mit den Daten von Bellmann *et al.* (2001) überein. Die Blaufärbung, und damit die *lacZ*-Expression von 13032::*brnF-2-lacZ* war dagegen auf CgXII-Minimalmedium etwas stärker. Bis auf die Aminosäure Threonin schien die Expression bei allen Zusätzen zum Minimalmedium geringer. Es wurde jedoch auch eine Beeinträchtigung des Wachstums bei diesen hohen Aminosäurekonzentrationen festgestellt, was einen direkten Vergleich der Blaufärbung erschwert. Eine Beeinträchtigung des Wachstums wurde hingegen nicht beobachtet bei Zusatz von 1 % Casein und auf BHI-Komplexmedium. Daher scheint die geringere Blaufärbung auf diesen Medium tatsächlich einer verringerten *lacZ*-Expression zu entsprechen. Um diese qualitativen Beobachtungen zu quantifizieren, wurde in Rohextrakten von *C. glutamicum* 13032::*brnF-2-lacZ* die

β -Galaktosidase Aktivität bestimmt. Dabei wurde die Aktivität in CgXII-Minimalmedium, sowie in BHI-Komplexmedium untersucht. Da ein weiteres denkbare Substrat von BrnFE-2 kurzkettige Fettsäuren sind, wurde in einem zusätzlichen Experiment die Aktivität in BHI-Medium plus 1 % Butterhydrolysat, das aus einem Gemisch verschiedenster Fettsäuren besteht, quantifiziert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten in Rohextrakten von Zellen, die in der exponentiellen Phase geerntet wurden, bestimmt.

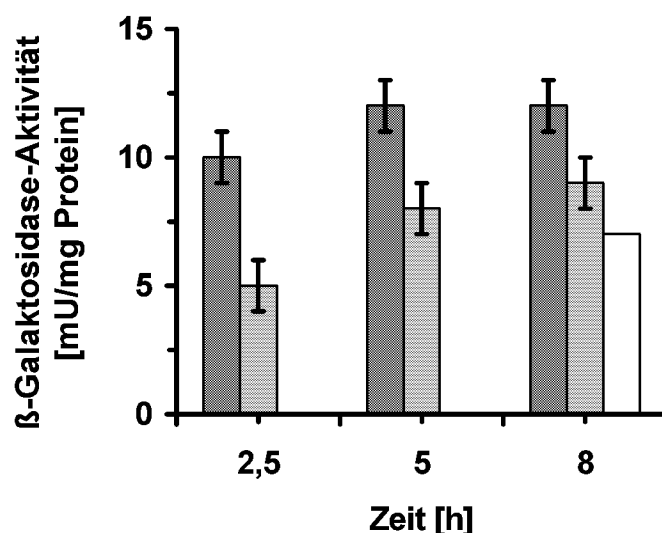


Abb. 21: Spezifische β -Galactosidaseaktivität des Stammes *C. glutamicum* 13032:: *brnF-2-lacZ* in CgXII-Minimalmedium (dunkel grau), auf BHI-Vollmedium (hellgrau), mit 1 % Buttersäurehydrolysat (weiß). Soweit Fehlerbalken angegeben, sind Mittelwerte aus drei Enzymtests einer Kultivierung mit deren Standardabweichungen angegeben.

Wie in Abb. 21 erkennbar, ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität auf CgXII-Medium nahezu doppelt so hoch, wie auf BHI-Medium. Offensichtlich ist die Expression von *brnF-2* in Minimalmedium induziert, gegenüber BHI-Vollmedium, was bereits im Plattentest qualitativ beobachtet wurde. Die spezifische β -Galaktosidaseaktivität in BHI-Medium mit 1 % Buttersäurehydrolysat wurde in diesem Experiment mit 7 mU/ mg bestimmt. Da diese Aktivität, gegenüber der Aktivität in BHI-Medium ohne Buttersäurehydrolysat praktisch nicht verändert ist, ist davon auszugehen, dass die in dem Hydrolysat vorhandenen Fettsäuren die *brnF-2*-Expression nicht beeinflussen und somit vermutlich kein Substrat von BrnFE-2 darstellen.

3.3 Untersuchungen zur Struktur des Isoleucinexporters

Bei Membranproteinen lassen sich Strukturvorhersagen relativ einfach aus der Primärstruktur ableiten. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse, wie Hydropathie und Amphipathie wird noch erhöht, wenn zur Analyse möglichst viele Vertreter einer Proteinfamilie herangezogen werden, da auf diese Weise Abweichungen in der Struktur bei Einzelfällen vermieden werden (Zhai & Saier, 2001). Um die durchschnittliche Hydropathie, Amphipathie und Ähnlichkeit zu bestimmen, wurde das im Internet zur Verfügung stehende Programm AveHAS verwendet, dessen Ergebnis für BrnF und BrnE in Abb. 15 dargestellt ist. Es zeigen sich begrenzte Bereiche hoher Hydrophobizität, die sehr wahrscheinlich mit Transmembranhelices korrelieren. Es macht 7 Transmembranhelices (TMH) für BrnF und 4 für BrnE wahrscheinlich. Die durchschnittliche Ähnlichkeit ist am höchsten in den Bereichen hoher Hydrophobizität, und somit der Transmembranhelices. Auffallend ist auch die geringe Ähnlichkeit der BrnF-Proteine im N- und C-terminalen Bereich. Bei den BrnE-Proteinen wiederum ist der N-Terminus bereits stark hydrophob und bildet möglicherweise eine Transmembranhelix.

Da davon auszugehen ist, dass viele Transmembrantransporter durch Genduplikation entstanden sind (Saier, 1994; Murakami *et al.*, 2002), ist dies auch für BrnFE denkbar. Um dies zu untersuchen, wurde nach Übereinstimmungen in der Sequenz von BrnF und BrnE gesucht. Dabei zeigten beispielsweise die vier letzten Transmembranhelices von BrnF bei *M. loti* Identitäten zum BrnE Protein, wobei die Wahrscheinlichkeit zufälliger Sequenzübereinstimmung bei 10^{-5} lag. Diese Wahrscheinlichkeit lässt zwar Homologien vermuten, ist aber unzureichend, um einen gemeinsamen Urahn zu etablieren.

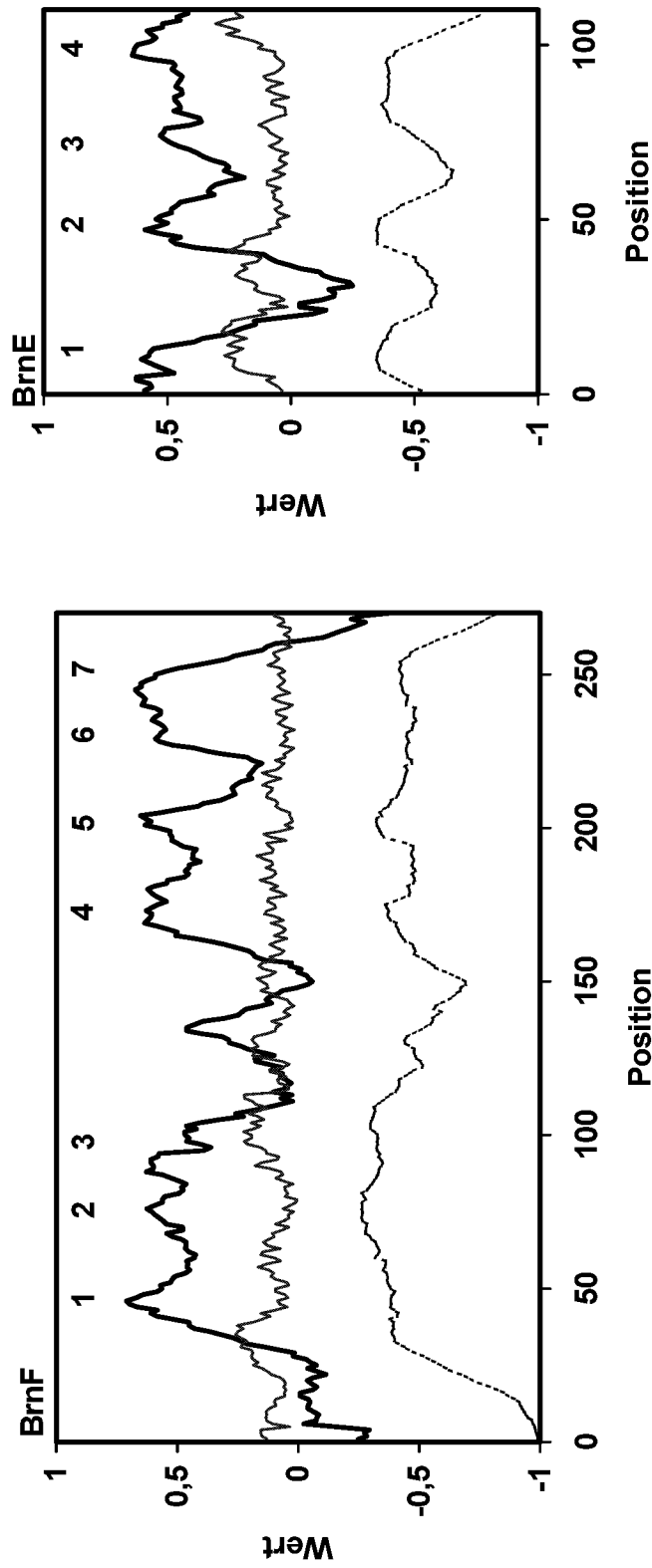


Abb. 15: Computergestützte Analyse der mittlere Hydrophathie (obere, durchgezogene Linie), Amphipathie (mittlere, graue Linie) und Ähnlichkeit (untere, gestrichelte Linie) für die Transporter der LIV-E Familie durch das Programm AveHAS. Aufgetragen ist der jeweilige mittlere Wert gegen die Aminosäureposition im Protein. Die Zahlen oberhalb des Hydrophathie-Plots geben die Position der möglichen Transmembranhelices an. Die Plots wurden durch das AveHAS-Programm erzeugt, das auf einem multiplen Sequenzalignment durch Clustal X beruht (Thompson *et al.*, 1997).

Da die physiologischen Exportratenmessungen in *C. glutamicum* klar zeigten, dass BrnF-1 und BrnE-1 nur gemeinsam einen funktionell aktiven Exportcarrier bilden, wurde die vermutete Interaktion der Proteine untersucht. Eine Interaktion von Proteinen kann nachgewiesen werden, indem eine Ko-Aufreinigung des Komplexes erreicht wird. In *C. glutamicum* ist es bereits gelungen die Proteininteraktion des membranständigen Atmungskettenkomplexes (CtaCDE und QcrABC) durch Ko-Aufreinigung nachzuweisen (Niebisch and Bott, 2002). Dabei wurde eines der Proteine mit einem *Tag* versehen und durch eine native Proteinaufreinigung die interagierenden Untereinheiten ko-aufgereinigt. Durch die Analyse der ko-aufgereinigten Proteine mittels MALDI-TOF-MS konnten die interagierende Proteine des Atmungskettenkomplexes identifiziert werden. Auf ähnliche Weise wurde die Untersuchung mit dem Exportcarrier für verzweigtkettige Aminosäuren BrnFE durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden eine Fusion der Gene mit der Sequenz für sechs Histidinreste durchgeführt, wobei das entstehende Protein durch Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden kann. Zur Herstellung der His-Tag-Fusion am 3'-Ende von *brnE*, wurde mit den Primern *brnE*-his-down_2 und upper-*brnFE* ein 1269 bp großes Fragment in einer PCR gewonnen und in die *Xba*I-site des *multi-copy* Plasmid pJC1 kloniert (Abb. 22). Das Insert des so erhaltenen Plasmides wurde mit dem innerhalb von *brnE* anlagernden Primer 810-112-R3 ansequenziert und die *in-frame* Fusion der sechs Histidincodons mit *brnE* nachgewiesen. Das Plasmid pJC1*brnFE*(His)₆ wurde durch Elektroporation in *C. glutamicum*Δ*brnFE* eingebracht. Um sicherzustellen, dass dieses Konstrukt einen aktiven Exporter ausbildet, wurde die Exportrate für Isoleucin bestimmt. Die dabei erhaltene Exportrate von 3,5 nmol min⁻¹ mg⁻¹ zeigt zwar, dass der Export wieder hergestellt war, aber mit eingeschränkter Aktivität, was vermutlich auf die Fusion mit den sechs Histidinresten zurückzuführen ist.

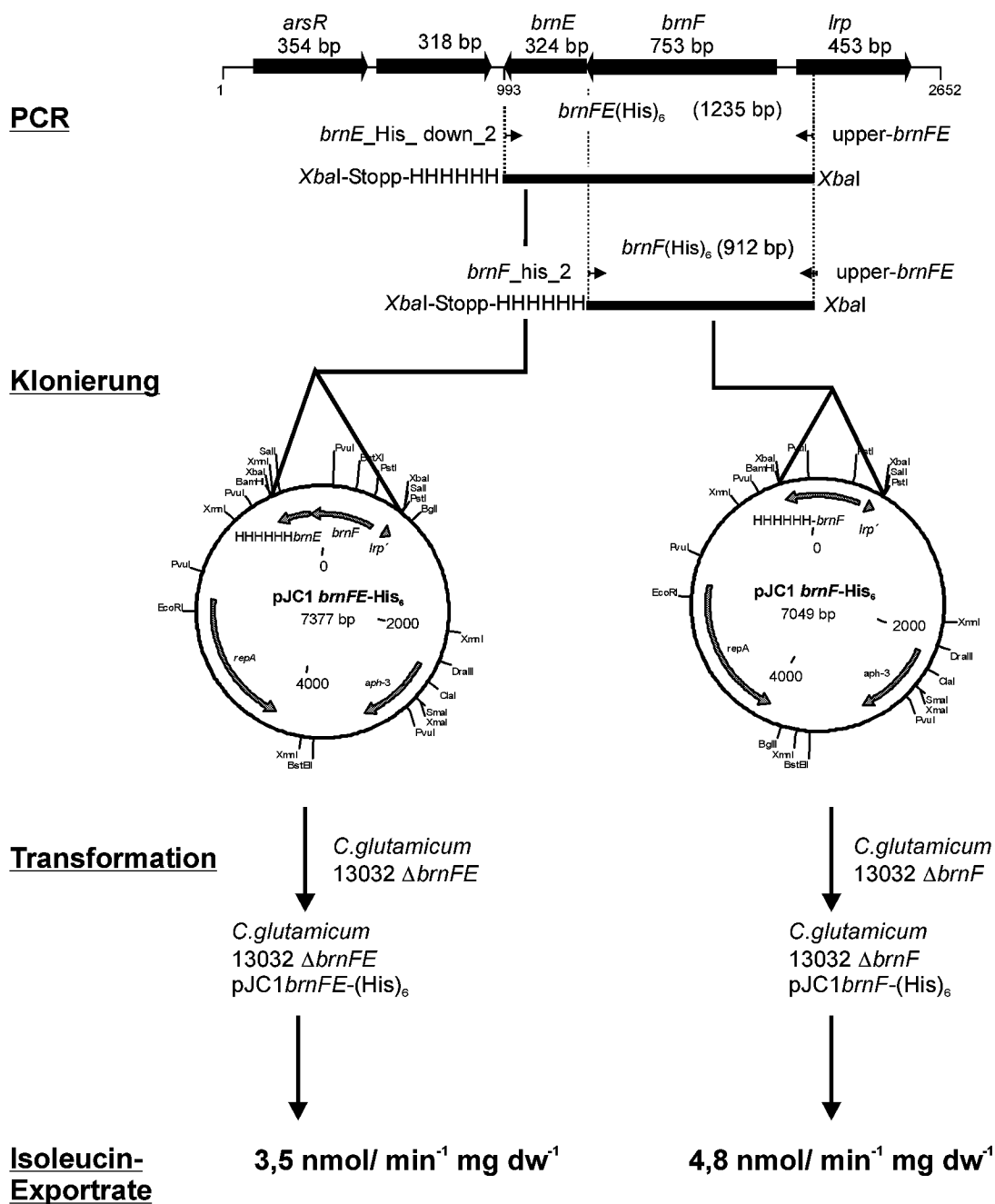


Abb. 22: Schematische Übersicht zur Konstruktion von His-Tag-Fusionsprotein von BrnF (links) und BrnE (rechts). Oben ist die Anordnung der Gene durch dickere Pfeile dargestellt. Die darunter liegenden Balken stellen die in der PCR amplifizierte Fragmente dar, wobei die dünneren Pfeile die PCR-Primer markieren. Die an die Balken geschriebenen Bezeichnungen stellen die durch die Primer eingefügten Kodons, bzw. Schnittstellen dar. Nach Klonierung in den *multi-copy* Vektor pJC1 und anschließender Transformation von *C. glutamicum* Δ *brnFE* bzw. *C. glutamicum* Δ *brnF* wurden die Exportraten für Isoleucin bestimmt. Die Exportraten beider Deletionsstämme mit Leerplasmid war nicht nachweisbar.

Mit dem Stamm *C. glutamicum* $\Delta brnFE$ pJC1*brnFE*(His)₆ wurde zunächst untersucht, ob BrnE-(His)₆ direkt aus den Membranen von *C. glutamicum* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden kann. Die Durchführung erfolgte wie im Material und Methoden-Teil beschrieben. Dabei zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen kein Protein von 8-12 kDa, was der Größe von BrnE-(His)₆ entsprechen würde, nachgewiesen werden konnte. Da dieser Befund bedeuten könnte, dass die sechs Histidinreste von BrnE-(His)₆ aufgrund der nativen Konformation nicht mit dem Säulenmaterial interagieren, wurde der Rohextrakt und die einzelnen Zellfraktionen, ohne weitere Aufreinigung auf Vorhandensein des mit dem His-Tag versehene Proteins mittels Western Blot Analyse geprüft (Abb. 23). Auch hier gelang es nicht, BrnE-(His)₆ nachzuweisen. Dies lässt vermuten, dass (i) das His-Tag das Protein destabilisiert, (ii) das die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt oder (iii) die Expression des *brnE*-Gens grundsätzlich reduziert ist.

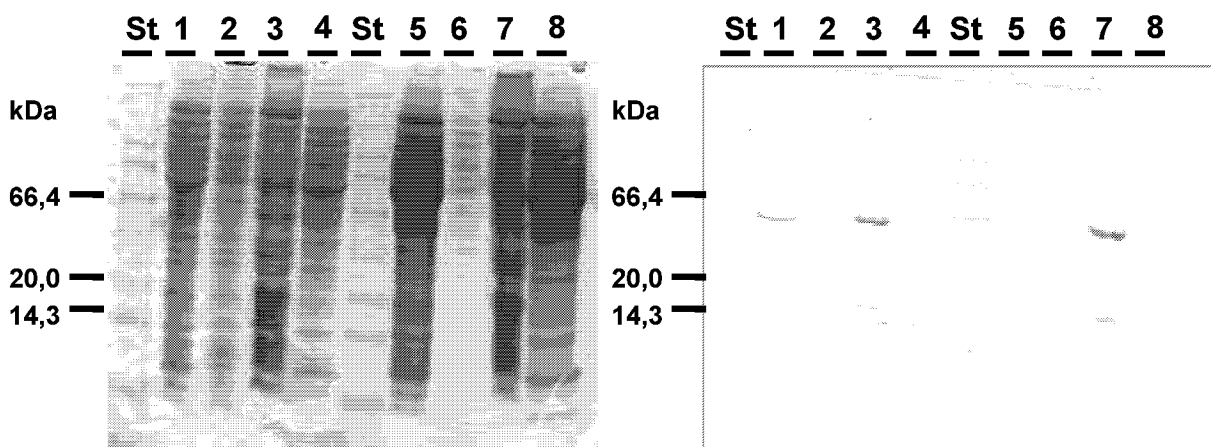


Abb. 23: Nachweis von Proteinen nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 12 % Bis-Tris Gel (links) und dessen Analyse auf Vorhandensein eines His-Tags im Western Blot (rechts). Aufgetragen wurden 16 µl der Zellfraktionen des Wildtyps (1-4) und von *C. glutamicum* $\Delta brnFE$ pJC1*brnFE*(His)₆ (5-8). (1/5: Rohextrakte; 2/6: Zelltrümmer; 3/7: Membranfraktion; 4/8: cytoplasmatische Fraktion). Als Standard (St) wurde der vorgefärbte See Blue Marker von Invitrogene verwendet.

Da die bei den Untersuchungen zu BrnE-(His)₆ aufgetauchten Probleme nicht zwangsläufig auch bei Untersuchungen zu BrnF auftreten müssen, wurde hier ebenfalls eine Proteinaufreinigung eines mit sechs Histidinresten versehenen Proteins durchgeführt. Zur Herstellung der C-terminalen His-Tag-Fusion wurde mit

den Primern *brnF_his_2* und *upper-brnFE* in einer PCR ein 947 bp großes *brnF*-PCR-Fragment erhalten, das in die *XbaI* von pUC18 kloniert wurde. Die Richtigkeit des erhaltenen Plasmids pUC18*brnF*(His)₆ wurde durch Restriktionsanalyse bestätigt und die *in-frame* Verknüpfung der sechs Histidincodons am 3'-Ende von *brnF* durch Sequenzierung mit Standardprimern überprüft. Das *XbaI*-Fragment aus diesem Vektor wurde in die *XbaI*-site von pJC1 umkloniert und *C. glutamicum* Δ *brnF* mit pJC1*brnF*(His)₆ transformiert. Die Wiederherstellung der Isoleucin-exportrate auf 4,8 nmol min⁻¹ mg dw⁻¹ zeigte, dass dieses Gen exprimiert wird und wiederum ein funktioneller Exporter durch BrnF-(His)₆ rekonstituiert wurde. Daher wurde versucht BrnF-(His)₆ aus den Membranen von *C. glutamicum* Δ *brnF*/pJC1*brnF*(His)₆ über Ni-NTA-Chromatographie aufzureinigen. Parallel wurde ein weiterer Versuch unternommen BrnE-(His)₆ aus *C. glutamicum* Δ *brnFE*/pJC1*brnFE*(His)₆ zu isolieren. Die Elutionsfraktionen dieser Aufreinigung wurden mittels NuPage und Western Blot Analysen auf Vorhandensein der Proteine untersucht (Abb. 24).

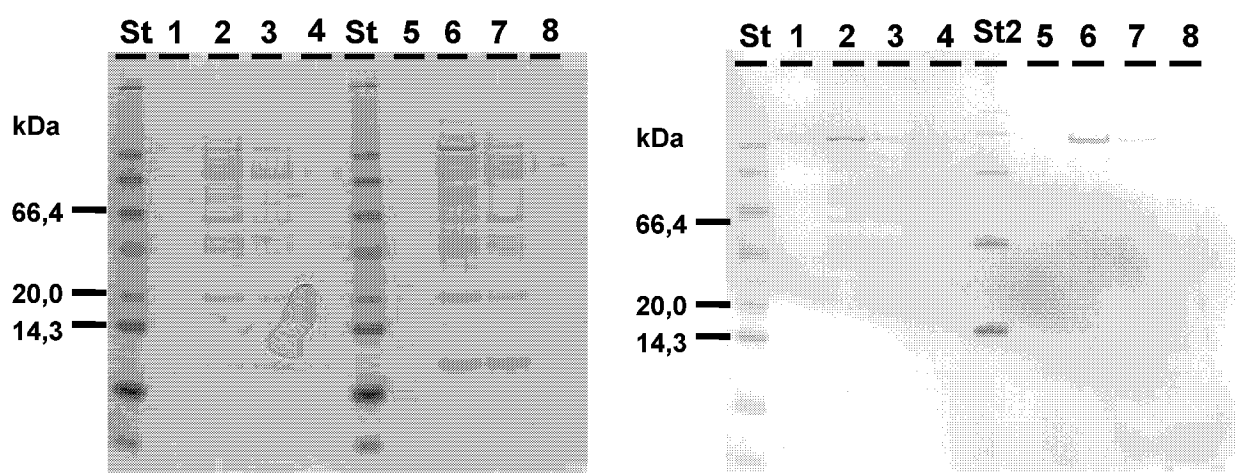


Abb. 24: Nachweis von Proteinen nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 12 % BisTris Gel (links) und dessen Analyse auf Vorhandensein eines His-Tags im Western Blot (rechts). In Spur 1-4 sind die Elutionsfraktionen nach Aufreinigung möglicher His-Tag-Proteine aus *C. glutamicum* Δ *brnF*/pJC1*brnF*(His)₆ aufgetragen. In Spur 5-8 sind die Elutionsfraktionen nach Aufreinigung möglicher His-Tag-Proteine aus *C. glutamicum* Δ *brnFE*/pJC1*brnFE*(His)₆ aufgetragen. rechts: NuPage des mutmaßlichen BrnF-(His)₆ und BrnE-(His)₆. links: Western Blot mit Detektion der Proteine durch Ni-NTA-AP-Konjugat und anschließender Farbreaktion mit NBT/BCIP der Elutionsfraktionen 1-4. Als Standard (St) wurde der vorgefärbte See Blue Marker von Invitrogene verwendet und die 6xHis-Protein Leiter (St2) von Qiagen.

Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels NuPage zeigte zwei Proteine, die mit ca. 20 kDa und ca. 10 kDa den Massen von BrnF-(His)₆ und BrnE-(His)₆ entsprechen könnten (Abb. 24). Die MALDI-TOF-MS Analyse dieser beiden Proteine, die von S. Schaffer⁷ durchgeführt wurde, ergab aber, dass das Massenspektrum nach tryptischem Verdau des 20 kDa-Proteins nicht mit den theoretischen Massen BrnF- oder BrnE- spezifischer Fragmente übereinstimmte. Die Massen des ca. 10 kDa-Proteins stimmten mit denen eines ribosomalen Proteins überein. Somit handelt es sich bei den beiden Proteinen nicht um BrnF-(His)₆ oder BrnE-(His)₆.

Auch die Western Blot Analyse der Elutionsfraktionen ergab keinen Hinweis auf ein His-Tag-Protein in entsprechender Größe, obwohl die Detektion der 6x-His-Proteine des Standards einwandfrei war. Demnach ist es ebenfalls nicht möglich BrnF-(His)₆ wie BrnE-(His)₆ direkt in nachweisbarer Menge aufzureinigen. Daher wurde versucht, in einem letzten Ansatz BrnF-(His)₆ ohne weitere Aufreinigung durch Western Blot Analysen in Zellfraktionen nachzuweisen. Das ca. 28,7 kDa Protein konnte unter keiner der gewählten Bedingungen nachgewiesen werden. Auch in *E. coli* war mit dem Konstrukt pUC18brnF(His)₆ der Nachweis des spezifischen Proteins nicht möglich. Da es sich als schwierig erwies, die His-Tag-Proteine überhaupt nachzuweisen und so die zum Ziel gesetzte Koaufrreinigung des Komplexes nicht möglich ist, wurden hierzu die Arbeiten eingestellt.

Ähnliche Erfahrungen wurden bei Protein-biochemischen Untersuchungen zum Lysinexporter (LysE) gemacht. Durch Überexpression von *lysE* durch das *multi-copy* Plasmid pJC1 war es nicht möglich, LysE durch Western Blot Analysen mit anschließender Immunreaktion nachzuweisen, was auf äußerst geringe Proteinkonzentrationen schließen lässt (Vrljic *et al.*, 1996; B. Haier, Dissertation 2000, Köln).

⁷ Arbeitsgruppe M. Bott, Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich

4 Einfluss des Transportes verzweigtkettiger Aminosäuren auf die Isoleucinbildung mit *C. glutamicum*

Wie die Arbeiten von Morbach *et al.*, 1996 zeigten, kann der Export von L-Isoleucin die Produktion limitieren. Dies ist zu schließen, da die interne Konzentration von L-Isoleucin und dessen unmittelbarer Vorstufe α -Ketomethylvalerat während der Produktion fast doppelt so hoch ist, wie deren externe Konzentrationen. Des weiteren wurde von T. Hermann (Dissertation, 1998) vermutet, dass die Aufnahme von L-Isoleucin durch das Aufnahmesystem BrnQ nachteilig für die Produktion ist, da die Aufnahme der externen Akkumulation entgegen wirkt (Tauch *et al.*, 1998). Es wurde deswegen der Einfluss des identifizierten Exportcarriers BrnFE sowie der Einfluss des Importcarriers BrnQ auf die Produktion von L-Isoleucin untersucht.

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die Isoleucinbildung durch Überexpression der Isoleucinexportergene generell verbessert werden kann. Um das in Kapitel 2.2 beschriebene Konstrukt pJC1*brnFE* verwenden zu können, das die Exportrate für Isoleucin nachweislich verbessert (siehe Kapitel 2.3), wurde der Lysin- und Threoninproduzent *C. glutamicum* DM368-2 verwendet (Reinscheidt *et al.*, 1994). Dieser Stamm besitzt die Gene der *feed-back* resistenten Aspartatkinase und Homoserindehydrogenase und scheidet neben Lysin und Threonin ca. 1 mM Isoleucin aus. Diese geringe Produktkonzentration sollte mögliche toxische Sekundäreffekte ausschliessen. Zur Überexpression der Exportergene wurde in diesen Stamm pJC1*brnFE* eingebracht. Als Kontrollstamm wurde DM368-2/ pZ1 verwendet. Um nun zu prüfen, ob die Überexpression der Exportergene die Isoleucinbildung verbessert, wurde ein Wachstumsexperiment mit Minimalmedium CgXII plus 4 % Glucose durchgeführt und die externen Isoleucinkonzentrationen nach 24, 48 und 72 h bestimmt (Abb. 25).

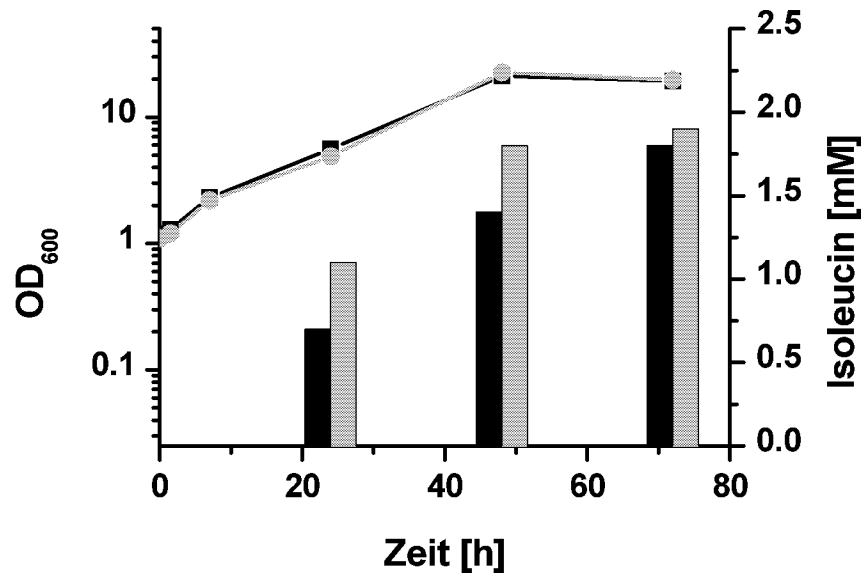


Abb. 25: Einfluss von BrnFE auf die Isoleucinbildung mit *C. glutamicum* DM368-2. Gezeigt ist die OD₆₀₀ (Linien) und die externe Isoleucinkonzentration (Balken) während einer Kultivierung der Stämme DM368-2/ pZ1 (■, bzw. schwarze Balken) und DM368-2/ pJC1brnFE (◆, bzw. graue Balken) in CgXII mit 4 % Glucose.

Es wird deutlich, dass die externe Isoleucinkonzentration im *brnFE*-überexprimierenden Stamm über die gesamte Kultivierungsdauer höher ist als im Kontrollstamm DM368-2/ pZ1. Das Wachstum beider Stämme ist nahezu identisch. Damit ist gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist durch Überexpression der Exportergene die Isoleucinbildung zu verbessern. Allerdings handelt es sich um sehr geringe Isoleucinkonzentrationen und es ist fraglich, ob dieser Effekt bei Stämmen mit verbesserter Produktionsleistung ebenfalls zu beobachten ist.

Um dies im folgenden zu untersuchen wurden die zur Zeit besten zur Verfügung stehenden Isoleucinproduzenten aus den Arbeiten von Morbach *et al.* (1996) verwendet. Hier wurde ausgehend von dem für Leucin auxotrophen Lysinproduzenten MH20-22B durch Überexpression und Deregulierung von Threonin- bzw. Isoleucinsynthesegenen eine externe Akkumulation bis zu 65 mM erreicht.

4.1 Einfluss des Exporters BrnFE auf die Isoleucinbildung in MH20-22BΔ*lysA*

Um die Lysinbildung während der Isoleucinproduktion zu unterbinden, nicht aber die Bildung des für die Zellwand wichtigen meso-Diaminopimelats, wurde das *lysA*-Gen (Oguiza, 1993), das für die den letzten Schritt der Lysinsynthese katalysierende Diaminopimelatdecarboxylase kodiert, deletiert und MH20-22BΔ*lysA* erhalten. Zur gemeinsamen Überexpression der Exportergene *brnFE* mit den Isoleucinbiosynthesegenen, wurde der Vektor pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* konstruiert.

Um nachzuweisen, dass durch dieses Plasmid der Export von Isoleucin vermittelt werden kann, wurde mit Kontrollstämmen die Exportrate bestimmt. Dazu wurde pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* und pECM3*ilvA*^{wt} in *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum* 13032Δ*brnFE* durch Konjugation eingebracht. Die erhaltenen Exportraten für Isoleucin sind in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18: Prüfung der Funktion des durch pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* kodierten Isoleucin-exporters in *C. glutamicum* 13032 durch Messung der Exportraten.

<i>C. glutamicum</i>	L-Isoleucinexportrate
Stamm	(nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
13032/ pECM3 <i>ilvA</i> ^{wt}	6,8; 5,7 ^a
13032/ pECM3 <i>ilvA</i> ^{wt} <i>brnFE</i>	8,6; 7,7 ^a
13032Δ <i>brnFE</i> / pECM3 <i>ilvA</i> ^{wt}	0,5
13032Δ <i>brnFE</i> / pECM3 <i>ilvA</i> ^{wt} <i>brnFE</i>	5,6

^a Es wurden zwei Werte unabhängig bestimmt.

Die Daten aus Tab. 1 zeigen, dass der Export von Isoleucin durch das Konstrukt pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* vermittelt und auch leicht gesteigert werden kann. Daher wurde dieses Plasmid in den Stamm MH20-22BΔ*lysA* zusammen mit dem weiteren Isoleucinsynthesegene überexprimierenden Plasmid pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* eingebracht. Drei Klone des Kontrollstammes MH20-22BΔ*lysA*/ pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* pECM3*ilvA*^{wt} lagen bereits vor (K. Krumbach), wobei hier beide Plasmide durch Elektroporation eingebracht worden waren.

Zur Untersuchung der Produktbildung wurden je drei Klone dieses Stammpaars in CgXII mit 4 % Glucose und je 2,1 mM Lysin und Leucin, sowie 7 µg/ ml Chloramphenicol und 25 µg/ ml Kanamycin kultiviert. Die Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand wurden nach 12, 24 und 48 h bestimmt. Dabei zeigte sich mit geringer Abweichung eine maximale Konzentration von 60 mM im *brnFE*-überexprimierenden Stamm. Da der Kontrollstamm, ohne *brnFE*-Überexpression lediglich ca. 45 mM Isoleucin extern akkumuliert, deutete dies auf einen starken Effekt der *brnFE*-Überexpression hin. Die externe Isoleucinakkumulation wurde in einer unabhängigen Kultivierung kontrolliert, indem nur je ein Klon dreifach parallel kultiviert wurde (Abb. 26).

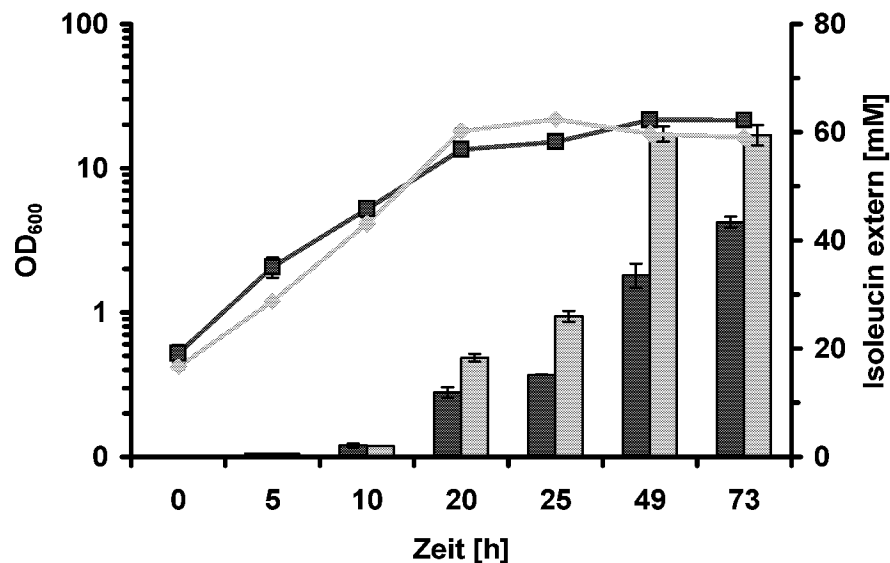


Abb. 26: Einfluss von BrnFE auf die Isoleucinbildung in MH20-22BΔ*lysA*-Stämmen. Die Stämme enthielten pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* pECM3*ilvA*^{wt} (dunkel, ■) oder pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* (hell, ◆). Die externen Isoleucinkonzentrationen sind in Balken und die OD₆₀₀ in Linien dargestellt. A: Mittelwerte mit Standardabweichung von je drei unabhängigen Klonen. B: Mittelwerte mit Standardabweichung einer zusätzlichen Kultivierung je eines einzelnen Klons in drei parallelen Ansätzen. Alle Kultivierungen wurden in CgXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose durchgeführt.

Auch bei dieser Kultivierung zeigte sich reproduzierbar und mit nur kleinen Fehlerbalken eine Verbesserung der Isoleucinbildung durch Überexpression von *brnFE*. Wie erwartet, ist bei diesen Stämmen keine Lysinausscheidung zu beobachten.

Diese Experimente zeigten einen überraschend starken, positiven Effekt der *brnFE*-Expression auf die externe Akkumulation von L-Isoleucin. In diesem Experiment war der Referenzstamm aus einer Glycerinkultur des Labors entnommen. Da bei der mehrstufigen Konstruktion, die Konjugations- und Elektroporationsschritte beinhaltet, bei jedem Schritt eine Klonauswahl unvermeidbar ist und Klon-zu-Klon Variationen insbesondere bei der Produktbildung eine sehr große Rolle spielen können, wurden zur Überprüfung des Experimentes erneut ausgehend von MH20-22B Δ *lysA*/ pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* beide Stämme parallel hergestellt. Jeweils drei unabhängige Klone der mit "Re" bezeichneten Stämme wurden in CgXII-Medium mit 4 % Glucose, 2,8 mM Leucin, 2,2 mM Lysin, sowie 7 µg/ ml Chloramphenicol und 25 µg/ ml Kanamycin kultiviert (Abb. 27).

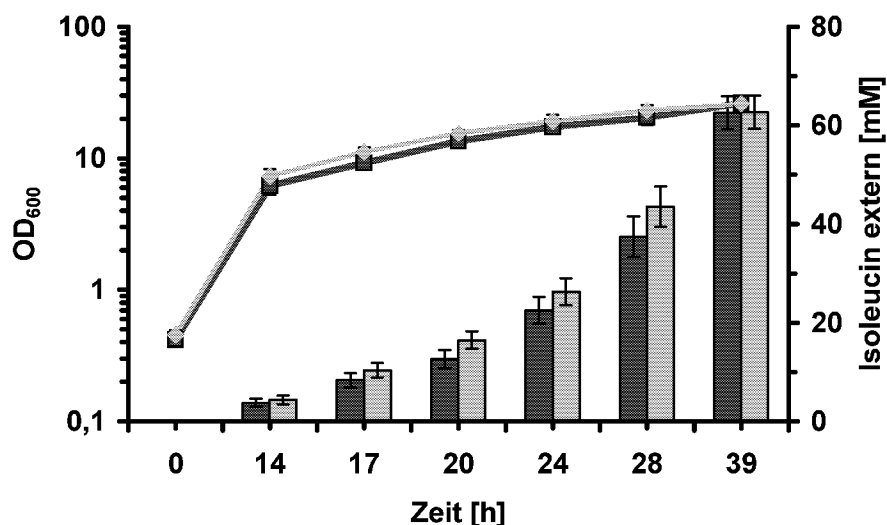


Abb. 27: Einfluss von BrnFE auf die Isoleucinbildung in MH20-22B Δ *lysA*-Stämmen. Die Stämme enthielten pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* pECM3*ilvA*^{wt} (dunkel, ■) oder pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* (hell, ◆). Mittelwerte der Isoleucin-konzentrationen (Balken) und der OD₆₀₀ (Linien) mit Standardabweichung bei Kultivierungen in CgXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose.

Wie aus Abb. 27 ersichtlich, liegt die externe Isoleucinkonzentration der beiden Stämme sehr dicht beieinander, so dass die Unterschiede innerhalb der Fehlerbalken liegen. Dieser relativ geringe Unterschied im Vergleich zum vorigen Experiment (Abb. 26) weist darauf hin, dass mögliche Klon-zu-Klon Variationen die

Produktbildung der Stämme beeinflussen. Solche Variationen sind bekannt und werden teilweise auch gezielt bei der Stammentwicklung eingesetzt. So ist beim derzeit für die Cysteinproduktion benutzten *E. coli* Stamm nach jedem Schritt des *metabolic engineering* aus mehreren Klonen der jeweils beste weiter benutzt worden (P. Heinrich, Wakker Chemie, persönliche Mitteilung).

Da während der Kultivierung der Isoleucinproduktionsstämme zu allen gemessenen Zeitpunkten eine tendenziell höhere Isoleucinkonzentration im *brnFE*-Überexpresierer vorlag, kann angenommen werden, dass die Produktbildung in sehr geringem Maße verbessert wird.

In weiteren Experimenten war angestrebt den Einfluss des Isoleucinexportes auf die Produktion mit dem Stamm M20-22 Δ *lysA* weiter zu charakterisieren, indem die Gene des Isoleucinexporters deletiert werden sollten. Die Abwesenheit von *brnFE* sollte zu einer geringeren externen Isoleucinakkumulation führen, was somit die Bedeutung des aktiven Exportes für die Produktion unterstreichen würde. Die Deletion von *brnFE* im Stamm M20-22B Δ *lysA* gelang erst nach mehreren Ansätzen (Abb. 43, Anhang), doch konnten in MH20-22B Δ *lysA* Δ *brnFE* nicht die beiden für die Produktion entscheidenden Plasmide eingebracht werden. Aufgrund dieser Schwierigkeiten musste auf die Charakterisierung entsprechender Stämme mit *brnFE*- und *lysA*-Deletion verzichtet werden.

4.2 Einfluss des Aufnahmesystems BrnQ auf die Isoleucinbildung

Um den Einfluss des Aufnahmesystems zu untersuchen, wurde das *brnQ*-Gen in den Stämmen *C. glutamicum* 13032, MH20-22B und MH20-22B Δ *lysA* deletiert. Bei der Überprüfung des Phänotyps der erhaltenen Stämme zeigte sich wie erwartet, dass MH20-22B Δ *brnQ* Leucin-auxotroph war und 13032 Δ *brnQ* auf CgXII-Medium ohne Supplemente wuchs. Da der Stamm MH20-22B Δ *lysA* Δ *brnQ* nicht in der Lage war auf CgXII mit Leucin und Lysin zu wachsen, wurden die Arbeiten mit diesem Stamm eingestellt und der Einfluss des Aufnahmesystems nur in MH20-22B Δ *brnQ* untersucht.

Nach dem Einbringen der Plasmide pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* und pECM3*ilvA*^{wt} bzw. pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* in die Stämme MH20-22B und MH20-22B Δ *brnQ* wurden je-

weils drei Klone der so erhaltenen vier verschiedenen Stämme in CgXII mit 4 % Glucose und 3,9 mM Leucin, sowie 7 µg/ ml Chloramphenicol und 25 µg/ ml Kanamycin, kultiviert und die Isoleucinbildung sowie die Leucinaufnahme quantifiziert (Abb. 28).

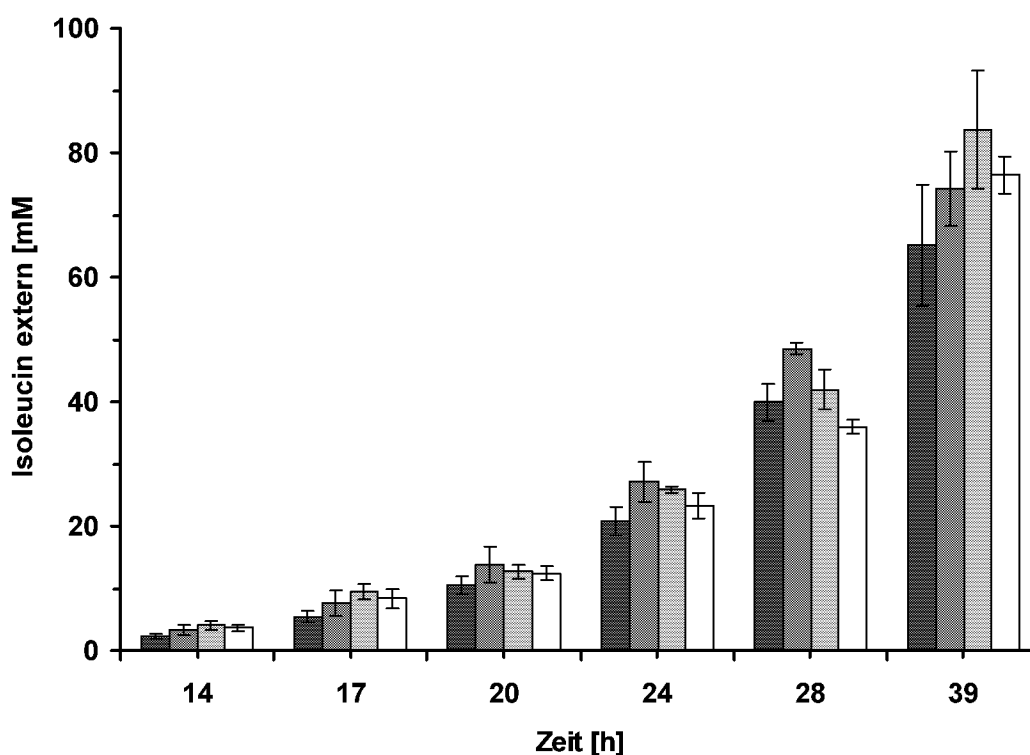


Abb. 28: Einfluss von BrnFE und BrnQ auf die Isoleucinbildung in MH20-22B- und MH20-22BΔbrnQ-Stämmen. Die Stämme enthielten pEK0hom^{Fbr} thrBthrC mit pECM3ilvA^{wt} oder pECM3ilvA^{wt} brnFE. Angegeben sind die Mittelwerte der Isoleucin-konzentration als Balken mit Standardabweichung.

MH20-22B/ pEK0hom^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA^{wt} (dunkel),

MH20-22B/ pEK0hom^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA^{wt} brnFE (grau),

MH20-22BΔbrnQ / pEK0hom^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA^{wt} brnFE (hellgrau),

MH20-22BΔbrnQ / pEK0hom^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA^{wt} (weiß)

Bei diesem Experiment wurden vergleichbare Wachstumsraten zwischen 0,15 h⁻¹ und 0,18 h⁻¹ ermittelt. Die detaillierten Daten sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (Tab. 21). Es zeigten sich keine sehr starken Unterschiede in der Isoleucinbildung, da in allen Fällen die Fehlerbalken überlappen. Zu jedem Zeitpunkt sind jedoch bestimmte Tendenzen zu erkennen, wobei (i) durch brnFE-Überexpression zu jedem Zeitpunkt mehr Isoleucin gebildet wird, als mit den

entsprechenden Kontrollstämmen. (ii) Beim Vergleich der *brnQ*-Deletion mit der Wildtypsituation zeigt sich jedoch weder durch das Plasmid pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* noch durch pECM3*ilvA*^{wt} eine klare Tendenz, da die Isoleucinkonzentrationen im Kultivierungsverlauf schon beim selben Stamm schwanken. Der *brnQ*-Deletionsstamm, der das Konstrukt pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* enthält, scheidet zwar im Mittel die größte Endproduktkonzentration nach 48 h aus (Tab. 21, Anhang), doch sind hier die Fehlerbalken auch besonders groß und dieser Effekt ist nicht kontinuierlich während der Kultivierung zu beobachten.

Die Analyse des zu Anfang zugesetzten Leucins ergab eine reduzierte Aufnahme des Leucins in der *brnQ*-Deletionsmutante. Sie beträgt in beiden *brnQ*-Deletionsstämmen etwa 0,021 mM/ h und in den Vergleichsstämmen 0,029 bzw. 0,03 mM/ h. Da BrnQ neben Isoleucin wahrscheinlich auch Valin und Leucin aufnimmt (Ebbighausen *et al.*, 1989b), ist die reduzierte Aufnahme von Leucin möglicherweise auf die *brnQ*-Deletion zurückzuführen. Da Leucin in diesem Fall ausschließlich durch Diffusion aufgenommen werden müsste, sind negative Effekte auf das Wachstum der Stämme nicht auszuschließen. Weiterhin ist festzustellen, dass die *brnQ*-Deletionsstämme lediglich maximal ca. 5 mM Lysin ausscheiden, während die Stämme MH20-22B/ pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* pECM3*ilvA*^{wt} und MH20-22B/ pEK0*hom*^{Fbr}*thrBthrC* pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE* im Mittel bis zu 25 mM Lysin bilden (Tab. 21, Anhang). Um eine zusätzliche statistische Aussage treffen zu können wurden alle Klone erneut durch Amino GmbH kultiviert und die Daten sind in Tab. 20 im Anhang aufgeführt. Bei den Analysen zeigte sich, dass eine gute Reproduzierbarkeit bezüglich der Produktkonzentrationen in Doppelbestimmungen eines Klons vorlag. Dennoch sind schon nach 24 h große Abweichung zwischen den einzelnen Klonen eines Stammes erkennbar, was mit unterschiedlichem Wachstum und Glucoseverbrauch korreliert. Aus diesem Grund sind die gebildeten Isoleucinkonzentrationen nicht mit denen der oben durchgeführten Kultivierung vergleichbar.

IV. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden ungerichtete Transposonmutanten auf Sensitivität gegenüber Isoleucyl-Isoleucin getestet, was zur molekularen Identifizierung des Isoleucinexporters BrnFE in *C. glutamicum* führte. Dies wirft die Frage auf, wodurch Peptidsensitivität bedingt wird. Neben anderen Mikroorganismen ist auch *E. coli* für die Fähigkeit bekannt Aminosäuren aus Peptiden zu bilden, wobei hier nachgewiesen wurde, dass die Peptide durch unspezifische Di- oder Tripeptid-Aufnahmesysteme aufgenommen und zellintern durch Hydrolasen in die entsprechenden Aminosäuren gespalten werden (Payne *et al.*, 1994; Payne & Bell, 1979). Auch *C. glutamicum* ist durch einen vermutlich ähnlichen Mechanismus in der Lage, Peptide aufzunehmen und intrazellulär zu hydrolysieren (Zittrich & Krämer, 1994). Dadurch kann es zu einer vorübergehenden internen Akkumulation der Aminosäuren kommen, aus denen das Peptid besteht (Zittrich & Krämer, 1994; Vrljic *et al.*, 1996; Simic *et al.*, 2001). In diesen Fällen wurde beobachtet, dass hohe interne Metabolitkonzentrationen mit reduziertem Wachstum korrelierten (Vrljic *et al.*, 1996, Simic *et al.*, 2001), was auf toxische Effekte schließen lässt. Wodurch diese letztendlich bedingt werden, ist noch unklar. Aber für Lysin wäre eine Interaktion der positiven Ladung der Aminogruppe mit den Phosphorylgruppen der DNA denkbar, wodurch eine Störung der Transkription und DNA-Replikation möglich wäre. Für hohe interne Isoleucinkonzentrationen wäre aufgrund der aliphatischen Seitenkette dieser Aminosäure eine Interaktion mit der Membran bzw. Lipiden der Zellwand möglich, was zur beobachteten Sensitivität führen könnte. Bei dreien der Peptid-sensitiven Transposonmutanten, sind die inaktivierten Genprodukte nicht am Export von Isoleucin direkt beteiligt. Trotzdem könnte bei ihnen ein Einfluss auf die Aktivität des identifizierten Carriers bestehen. So wurde für *C. glutamicum* festgestellt, dass Veränderungen in der Zellwand die Exkretion von Aminosäuren beeinflussen (Eggeling *et al.*, 2001). Ferner wurde eine im Lysinexport defekte Mutante isoliert, die weder eine Mutation im Lysinexportergen *lysE*, noch im Regulatorgen *lysG* aufwies (Vrljic *et al.*, 1995; Eggeling & Sahm, 2001). Die Ursache dieses Exportdefektes ist bisher nicht bekannt, es wird jedoch ein Veränderung der Zellwand vermutet. Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde festgestellt, dass die Sekundärstruktur des Aufnahmecarriers für verzweigtkettige Aminosäuren durch

Phospholipide stabilisiert werden kann (Uratani *et al.*, 1999). Auch beim Screening von Transposonmutanten auf Sensitivität gegenüber Threonin-haltigem Peptid wurden Gene identifiziert, deren Genprodukte nicht unmittelbar am Export von Threonin beteiligt sind (P. Simic, Dissertation, 2000). So ist in einer Mutante das Gen einer Trehalose-6-Phosphatsynthase inaktiviert. Dessen Funktion im Zusammenhang mit erhöhter Threonin-Sensitivität war bislang unbekannt. Mittlerweile hat sich aber herausgestellt, dass bei reduziertem Trehalosegehalt von *C. glutamicum* der Efflux von Aminosäuren wie Lysin oder Glutamat erheblich gesteigert ist (Izui *et al.*, 2002). Da Trehalose in *C. glutamicum* als Trehalosemycolat und Trehalosedimycolat Baustein der Zellwand ist, sind diese neuesten Befunde zumindest ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Zellwandaufbau und dem Effluxverhalten. Die beim Screening auf Isoleucyl-Isoleucin Sensitivität identifizierte Mg^{2+} -Chelatase könnte im Zusammenhang mit der Integrität der Lipidmembran bestehen. So ist für eine *E. coli* Mutante bekannt, dass deren veränderte Phospholipidzusammensetzung eine erhöhte Bedürftigkeit an zweiwertigen Ionen, insbesondere an Ca^{2+} und Mg^{2+} zur Folge hat (DeChavigny *et al.*, 1991). Es wird angenommen, dass diese zweiwertigen Ionen zusammen mit bestimmten Lipiden die Funktion des nicht mehr vorhandenen Lipides übernehmen können und auf diese Weise die Membranintegrität wieder hergestellt wird (DeChavigny *et al.*, 1991; Kruijff *et al.*, 1997). Da der entsprechende Genort der Mg^{2+} -Chelatase in *C. glutamicum* nicht inaktiviert werden konnte, ist davon auszugehen, dass dieses Protein eine essentielle Rolle für *C. glutamicum* spielt.

Für den identifizierten Exportcarrier BrnFE in *C. glutamicum* wurde festgestellt, dass die Peptidsensitivität nach Inaktivierung mit dem Unvermögen korreliert, L-Isoleucin aktiv zu exportieren. Weiterhin wurde durch Exportratenmessungen festgestellt, dass BrnFE in *C. glutamicum* der einzige am Export von Isoleucin beteiligte Carrier ist. Auch für den Lysinexportcarrier LysE wurde bei Inaktivierung kein Lysinexport mehr festgestellt (Vrljic *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu wurde beim Threoninexporter ThrE nach Inaktivierung noch Export gemessen, was auf die Existenz eines zweiten Carriers hinweist (Simic *et al.*, 2001). Die Untersuchungen zur Spezifität ergaben, dass BrnFE neben L-Isoleucin auch L-Leucin und L-Valin exportiert, wobei Valin die geringste Affinität zum Carrier hat. Nach

früheren Konkurrenzexperimenten wurde bereits vermutet, dass auch Leucin durch den gleichen Carrier exportiert wird, Valin aber eher nicht (Zittrich & Krämer, 1994; Hermann & Krämer, 1996). Durch die direkte Bestimmung der Exportrate konnte in dieser Arbeit die Frage der Spezifität geklärt werden. Die beobachtete Sensitivität der *brnFE*-Deletionsmutante gegenüber den toxischen Derivaten Norleucin und Norvalin weist auf den Transport auch dieser Substanzen durch BrnFE hin. Dies zeigt, dass die Substratspezifität nicht sehr eng begrenzt ist. Eine breite Substratspezifität kann ebenfalls für das Aufnahmesystem der verzweigt-kettigen Aminosäuren in *C. glutamicum* angenommen werden, da Konkurrenzexperimente eine Hemmung der Isoleucinaufnahme durch beispielsweise D,L-Azaleucin und Norvalin bis zu 53 % zeigten (Ebbighausen *et al.*, 1989b). Im Gegensatz dazu exportiert der Lysinexporter LysE sehr spezifisch Lysin und Arginin, nicht aber die ebenfalls basischen Aminosäuren Citrullin, Ornithin und Histidin (Bellmann *et al.*, 2001).

In *C. glutamicum* liegt das Gen des *lrp*-ähnlichen Regulators stromaufwärts, aber in divergenter Orientierung zu *brnF*. In *E. coli* wird die Expression einer Vielzahl von Genen teilweise Leucin-abhängig durch Lrp reguliert (Newman *et al.*, 1987). Kürzlich wurde durch Genom-weite Analysen festgestellt, dass Lrp in *E. coli* fast 1/10 aller Gene abhängig von der Wachstumsphase reguliert (Tani *et al.*, 2002). Es sind jedoch auch *lrp*-ähnliche Regulatoren bekannt, die spezifisch die Expression nur eines Genes, oder Operons regulieren. So ist in *B. subtilis* der *lrp*-ähnliche Regulator AzlB nur an der Expressionskontrolle des *azl*-Operons beteiligt (Belitsky *et al.*, 1997). In *C. glutamicum* war die Exportrate für Isoleucin in der in *lrp* Inaktivierungsmutante stark reduziert und in der *lrp*-Deletionsmutante nicht mehr nachweisbar. Dies deutet stark darauf hin, dass Lrp als Aktivator der *brnFE*-Expression benötigt wird. Auf der anderen Seite wird durch die Überexpression von *lrp* durch das *multi-copy* Plasmid pZ1 keine verstärkte Exportrate gemessen. Dies lässt vermuten, dass entweder das System unter den angewendeten Bedingungen maximal induziert ist oder Lrp die eigene Expression negativ autoreguliert, wie es für AzlB in *B. subtilis* (Belitsky *et al.*, 1997) beobachtet wurde. Ob Lrp in *C. glutamicum* ebenfalls ein globaler Regulator ist, ist bisher nicht bekannt. Auch die Expression des Lysinexportergens *lysE* wird durch den divergent transkribierten Regulator LysG reguliert. Obwohl *lysG* nicht essentiell für den

Export von Lysin ist (Vrljic *et al.*, 1996), wurde durch Expressionsstudien festgestellt, dass es sich um einen positiven Regulator handelt (Bellmann *et al.*, 2001).

Der in *C. glutamicum* identifizierte Exportcarrier BrnFE weist einige strukturelle Besonderheiten auf. So wurde durch die Bestimmung der Exportrate mit den verschiedenen Konstrukten nachgewiesen, dass beide Proteine zusammen für den Export benötigt werden. Dies legt eine heterodimere Struktur des Exportcarriers nahe. Da die meisten sekundären Transporter als Monomer oder Homodimer aktiv sind, ist die Struktur von BrnFE ungewöhnlich. Auch die Carrier der ThrE-Familie stellen eine Besonderheit dar (Yen *et al.*, 2002), wobei der Exporter aus *C. glutamicum* das einzige bislang funktionell charakterisierte Protein ist (Simic *et al.*, 2001). Dieser aus vermutlich 10 Transmembranhelices bestehende Carrier wird in *C. glutamicum* und weiteren Organismen durch ein Gen kodiert (Yen *et al.*, 2002). Bei vielen Gram negativen Bakterien wird der Carrier aber durch zwei benachbarte Gene kodiert (Yen *et al.*, 2002), die jeweils Proteine mit 5 Transmembranhelices ausbilden. Da zwischen den beiden hydrophoben Domänen von ThrE Sequenzidentitäten bestehen, wird hier eine Genduplikation im Verlaufe der Evolution vorgeschlagen. Die heterodimere Struktur der durch zwei Gene kodierten ThrE-Carrier kommt somit der eines Homodimers nahe (Yen *et al.*, 2002). Für BrnF und BrnE könnte angenommen werden, dass eine Genduplikation im Laufe der Evolution stattgefunden hat. Allerdings sind die Identitäten zwischen BrnE und den Hälften von BrnF zu gering um auf eine Verwandtschaft zu schließen. Außerdem wurde für *brnFE* in keinem einzigen Organismus eine Fusion der Gene oder eine getrennte Kodierung der zwei BrnF-Hälften festgestellt, sondern es zeigt sich stets die gleiche getrennte Kodierung von BrnF und BrnE (Abb. 29).

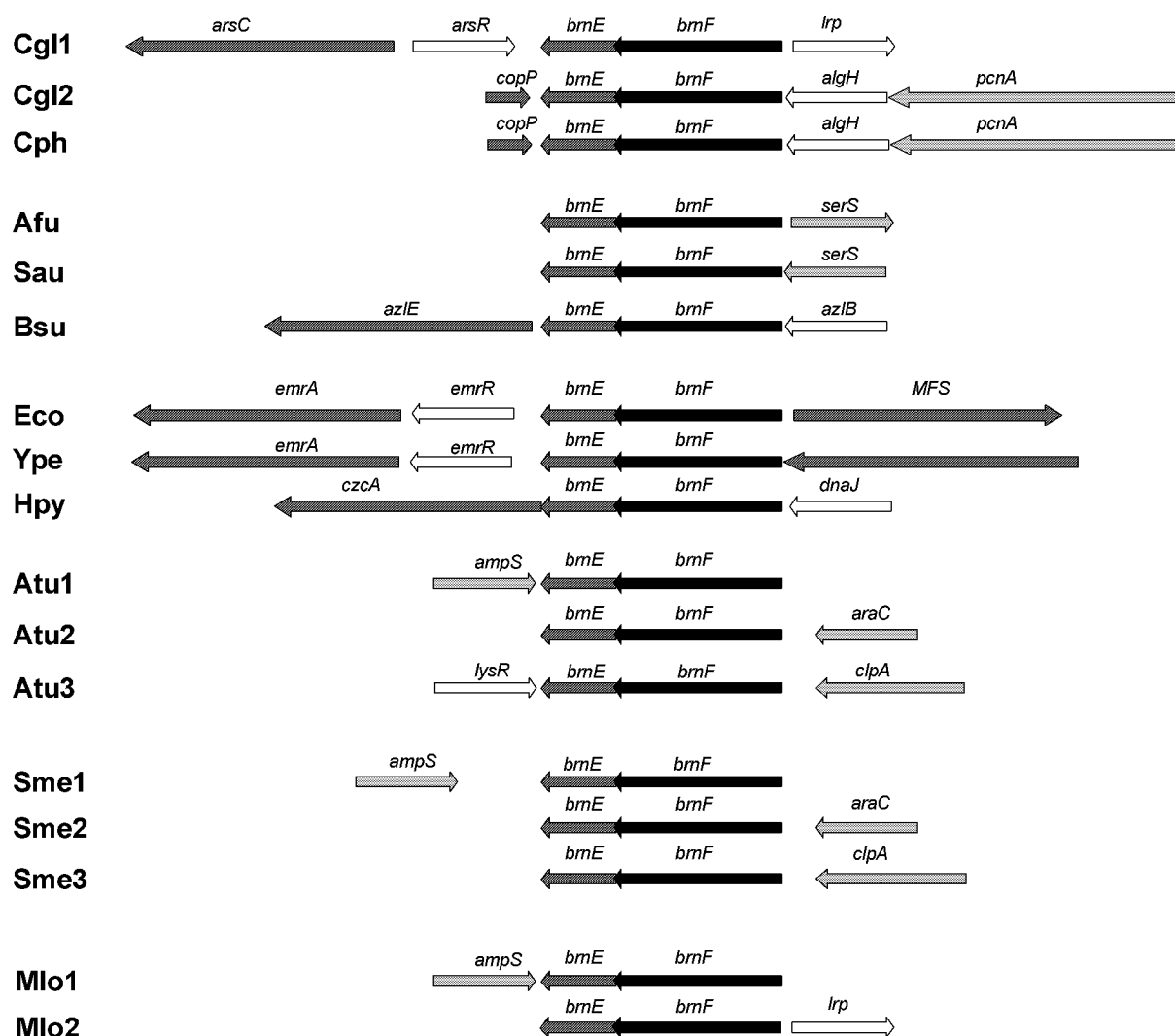


Abb. 29: Genanordnung einiger ausgewählter Mitglieder der LIV-E Familie. Abkürzungen, die nicht im Text beschrieben sind: *pcnA*: Poly-A-Polymerase; *copP*: Kupferbindeprotein; *serS*: Seryl-tRNA Synthetase; *araC*: Regulator der AraC-Familie, *lysR*: LysR-type Regulator; *c/pA*: caseinolytische Protease; *ampS*: Aminopeptidase; *MFS*: Transporter der *major facilitator superfamily* (Blattner *et al.*, 1997); *emr*: Erythromycinexporter (Miller *et al.*, 1996); *czcA*: Cadmium-Zink-Kobalt Resistenzgen (Tomb *et al.*, 1997).

Da die meisten Transporter 10-14 Transmembranhelices besitzen (Jack *et al.*, 2001), wird für Translokatoren, die aufgrund geringerer Größe weniger Transmembranhelices ausbilden können, eine Homodi- oder oligomerisierung vorgeschlagen (Putmann *et al.*, 2000). So wird dies auch für den aus wahrscheinlich fünf Transmembranhelices bestehenden Lysinexportcarrier LysE aus *C. glu-*

tamicum diskutiert (Bellmann *et al.*, 2001; B. Haier, Dissertation, 2000). Die kleinsten sekundär aktiven Transporter gehören zur Familie der *small multidrug resistance* (SMR) Proteine (Paulsen *et al.*, 1996a). Sie besitzen bei einer durchschnittlichen Größe von etwa 100 Aminosäureresten vier transmembrane Helices (Putmann *et al.*, 2000). In der Regel werden diese SMR Transporter durch ein Gen kodiert (Putmann *et al.*, 2000). Überraschenderweise werden in *B. subtilis* die meisten dieser Systeme aber durch zwei sehr ähnliche, homologe Gene kodiert (Putmann *et al.*, 2000). Obwohl die Proteine des Exporters für Ethidiumbromid EbrA und EbrB zu 46 % aus identischen Aminosäureresten bestehen, wurde durch physiologische Analysen gezeigt, dass beide Genprodukte für der Vermittlung der Resistenz essentiell sind (Masaoka *et al.*, 2000). Somit besteht der aktive Exporter EbrA und EbrB vermutlich aus einem Oligomer zweier homologer Proteine. Da BrnF und BrnE aber keine signifikante Ähnlichkeit zueinander aufweisen, stellt der heterodimere Aufbau dieses Exporters eine recht ungewöhnliche Struktur dar. Für das Malonataufnahmesystem MadLM in *Malonomonas rubra*, das aus einem Protein mit sieben (MadM) und einem mit vier (MadL) Transmembranhelices besteht, ist gezeigt, dass die Aufnahme nur bei Anwesenheit beider Gene katalysiert wird (Schaffitzel *et al.*, 1998). Bisher ist MadLM das einzige weitere, gut untersuchte System mit einem ähnlich ungewöhnlichen strukturellem Aufbau wie BrnEF.

Die Hydrophobizitätsanalyse, die nach Zhai und Saier (2001) durchgeführt wurde, ergibt, dass BrnF vermutlich sieben und BrnE vier Transmembranhelices besitzt (

Abb. 30). Abweichend davon, sagen Vorhersagen mit anderen Programmen, je nach Parametereinstellung, lediglich nur sechs Transmembranhelices für BrnF voraus (Rost *et al.*, 1995). Für den γ -Aminobuttersäure Transporter GabP aus *E. coli* wurde zunächst ein Topologiemodell mit 12, 13 oder 14 Transmembranhelices aufgestellt (Hu & King, 1998). Experimentelle Untersuchungen belegen jedoch eine Struktur mit 12 Transmembranhelices (Hu & King, 1998). Um für BrnF und BrnE eine genauere Vorstellungen der Topologie zu erhalten, müsste eine experimentelle Überprüfung, zum Beispiel mittels *phoA*- oder *lacZ*-Fusionen, erfolgen (Alexeyev & Winkler, 1999).

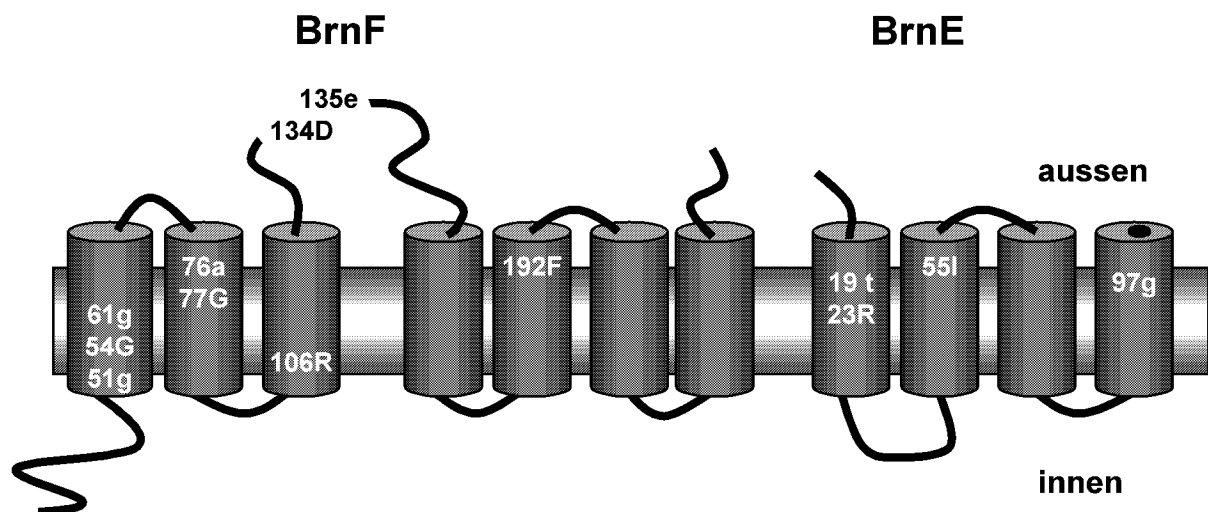


Abb. 30: Topologiemodell für BrnF und BrnE nach Zhai und Saier (2001), wobei die Zylinder Transmembranhelices darstellen und im Hintergrund die Membran schematisch eingezeichnet ist. Die Positionen konservierter Reste sind für BrnFE-1 von *C. glutamicum* angegeben. Die Kleinbuchstaben zeigen eine Konservierung in über 70 %, die Großbuchstaben eine in über 95% der Organismen an.

Interessant ist, dass neben zahlreichen hydrophoben Aminosäureresten auch einige geladene Reste in BrnF und BrnE konserviert sind. So findet sich in BrnF in der dritten und in BrnE in der ersten Transmembranhelix ein positiv geladener Argininrest. Geladene transmembrane Aminosäurereste können beim Transport eine wichtige Rolle spielen (Paulsen *et al.*, 1996, Muth und Schuldiner, 2000). So sind im Na⁺-Protonen Antiporter von *E. coli* drei transmembrane Aspartatreste konserviert, die für die Funktion essentiell sind (Inoue *et al.*, 1995). Da dies auch bei anderen Kationen-gekoppelten Transportern festgestellt wurde, liegt der Schluss nahe, dass diese negativ geladenen Aspartatreste für die Bindung der Kationen essentiell sind. Für den Isoleucinexport wurde als treibende Kraft eine Kotranslokation von Hydroxylionen vorgeschlagen (Hermann & Krämer, 1996). Da die beiden positiv geladenen transmembranen Argininreste konserviert sind, wäre im einfachsten Falle denkbar, dass diese direkt an der Bindung der Hydroxylionen beteiligt sind. Bei der mitochondrialen Carrier Familie sind positiv geladene Aminosäurereste in transmembranen Helices konserviert, die für den Transport

von Anionen essentiell sind (Laoli, 1999). So sind z.B. im *uncoupling protein* zwei Argininreste konserviert, die an der Translokation von Chloridionen beteiligt sind (Klingenberg & Echay, 2001). Weiterhin liegen in BrnF vier und in BrnE ein konservierter Glycinrest vor. Glycinreste kommen häufig in Transmembranhelices vor, sind aber für die Funktion nicht immer essentiell. Bei den Untersuchungen zur Lactosepermease aus *E. coli* wurden alle 417 Aminosäurereste individuell gegen Cystein ausgetauscht. Dabei stellte sich unter anderem heraus, dass nur einer von 36 Glycinresten für die optimale Funktion des Carriers wesentlich ist (Kaback, 1994). Glycin kann wie Prolin in Transmembranhelices eine Funktion als Helixbrecher haben (Grigorieff *et al.*, 1996). Folglich sind Glycinreste häufig in Positionen lokalisiert, in denen, bezogen auf die Quartärstruktur, eine dichte Packung von Transmembranhelices vorliegt (Javadpour *et al.*, 1999). Der vermutlich intrazellulär lokalisierte N-Terminus von BrnF zeigt keine konservierten Reste. Das steht auch mit dem Resultat im Einklang, dass im Stamm *C. glutamicum* ATCC14752 trotz zweier N-terminaler Aminosäureaustausche der Export von Isoleucin stattfindet. Daher ist wahrscheinlich, dass der N-Terminus für die Funktion nicht essentiell ist.

Für BrnFE in *C. glutamicum* ist klar gezeigt, dass Isoleucin, Leucin und mit geringerer Rate auch Valin exportiert wird. Da die verzweigtkettigen Aminosäuren unter Energieaufwand synthetisiert werden und die Biosynthese bereits stark reguliert ist (Cordes *et al.*, 1992; Möckel *et al.*, 1994; Patek *et al.*, 1994; Morbach *et al.*, 2000), stellt sich die Frage, ob der Export dieser Aminosäuren die physiologische Funktion von BrnFE ist. Unter den üblichen "Laborbedingungen", wie dem Verwenden von Minimal- oder Komplexmedium, zeigt die *brnFE*-Deletionsmutante keinen Phänotyp. Nur bei Zugabe von 3 mM Isoleucyl-Isoleucin oder 5 mM Alanyl-Leucin kommt es zu einer Wachstumsverzögerung. Darüber hinaus akkumuliert die Deletionsmutante Isoleucin und Leucin in Kurzzeiterperimenten nach Zugabe des entsprechenden Peptides. Es erscheint möglich, dass eine hohe interne Aminosäureakkumulation unter natürlichen Bedingungen zumindest zeitweise vorkommt. Als natürliche Umgebung von *C. glutamicum* ist mit Vogelfaeces kontaminierter Boden beschrieben worden (Woodruff, 1981). Da *C. glutamicum* Isoleucin nicht verstoffwechseln kann (Ebbighausen *et al.*, 1989a), scheint der Export unter sehr speziellen Bedingungen sinnvoll. Für den basischen

Aminosäureexporter LysE wurde festgestellt, dass dessen physiologische Funktion die Kontrolle des internen Lysin- oder Argininpools ist (Vrljic *et al.*, 1996). Bei Deletion von *lysE* ist *C. glutamicum* nicht in der Lage in Anwesenheit Lysin-haltiger Peptide oder auch auf Komplexmedium zu wachsen, da Lysin nicht metabolisiert werden kann und infolgedessen intern stark akkumuliert (Vrljic *et al.*, 1996). Obwohl auch Isoleucin ein Stoffwechselendprodukt ist, ist die *brnFE*-Deletionsmutante nach anfänglicher Wachstumsverzögerung trotzdem in der Lage sich an hohe Isoleucinkonzentrationen zu adaptieren. So erreichen die Kulturen der *brnFE*-Deletionsmutante bei Wachstum in Minimalmedium mit Peptid nach 28 h die gleiche End-OD wie der Wildtyp. Die verlangsamte Wachstumsrate stellt jedoch in direkter Konkurrenz zum Wildtyp einen Nachteil für *C. glutamicum* ohne *brnFE* dar. Diese Anpassung ist durch die Hydrophobizität von Isoleucin zu erklären, wodurch der Efflux auch durch Diffusion (Zittrich & Krämer, 1994) erfolgt.

Das einzige weitere zu BrnFE homologe System, das ansatzweise untersucht wurde, ist das an der Azaleucinresistenz beteiligte AzlCD aus *B. subtilis* (Belitsky *et al.*, 1997). Hier liegt ein Operon vor (Abb. 29), bei dem das erste Gen einen Lrp-ähnlichen Regulator (AzlB) kodiert. AzlB selbst reprimiert die Expression des gesamten Operons, wodurch gleichzeitig eine negative Autoregulation der Expression von *azlB* bedingt wird. Die Inaktivierung von AzlB führt dementsprechend zu vermehrter Expression der stromabwärtsgelegenen *azlD*- und *azlE*-Gene und damit zu einer Resistenz gegenüber dem Leucinanalogon D,L-Azaleucin. Wird *azlD* inaktiviert, hat dies den Verlust der Azaleucinresistenz zur Folge. Aufgrund dieses Ergebnisses und der Untersuchungen zu BrnFE kann angenommen werden, dass AzlD, vermutlich zusammen mit AzlC, als Azaleucinexporter die Resistenz vermittelt. Interessanterweise gibt es einen *Streptomyces neocaliberis* Stamm, der D,L-Azaleucin ausscheidet (Argoudelis *et al.*, 1967), so dass hier möglicherweise ebenfalls ein zu BrnFE homologer Exporter vorliegt, der für die Entgiftung der Zelle sorgt. Auch für den Export der antibiotisch wirksamen Lanthibiotika liegen häufig bereits in den Syntheseclustern Gene vor, die für entsprechende Exportsysteme kodieren (Guder *et al.*, 2000). Weitere durch BrnFE in *C. glutamicum* exportierte Substrate sind vermutlich Norvalin und Norleucin. Diese nicht proteinogenen Aminosäuren enthalten statt der verzweigten Seitenkette eine unverzweigte aliphatische Kette und können als

Nebenprodukte im Stoffwechsel der verzweigtkettigen Aminosäuren auftreten, wenn eine hohe Konzentration von α -Ketosäuren auftritt (Kisumi *et al.*, 1976; Kisumi *et al.*, 1976a). Für Norleucin wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass hohe interne Konzentrationen den Export von Isoleucin inhibieren (Hermann & Krämer, 1996). BrnFE könnte somit eine Rolle bei der Entgiftung der Zelle zukommen.

Der Befund, dass das paraloge BrnFE-2 System aus *C. glutamicum* nicht am Export der verzweigtkettigen Aminosäuren beteiligt ist, lässt vermuten, dass dieser Exporter eine bisher noch unbekannte Substanz exportiert. Es wäre denkbar, dass auch BrnFE-1 diese Substanz exportiert, aber im Laufe der Evolution die Substratspezifität verloren gegangen ist. Da die verzweigtkettigen Aminosäuren einen hydrophoben Charakter besitzen, wäre ein unspezifischer Export denkbar. So zeichnen sich die durch *multidrug resistance* Transporter (MDR) exportierten Substanzen häufig durch eine starke Hydrophobizität und nicht durch eine analoge Struktur aus (Neyfakh *et al.*, 2002). Die genomweite Analyse von 37 putativen Transportern in *E. coli* zeigte, dass 20 in der Lage waren, den Efflux von toxischen Substanzen zu katalysieren (Nishino & Yamaguchi, 2001). Der MDR-Transporter Bmr aus *B. subtilis* exportiert viele hydrophobe, toxische Substanzen wie Ethidium oder Norfloxacin (Neyfakh, 1991). Durch den Austausch eines konservierten Aminosäurerestes bei diesem Transporter wurde der Export dieser Substanzen überraschenderweise noch verbessert (Klyachko & Neyfakh, 1998). Dies ist ein Argument dafür, dass dieser Aminosäurerest nur für die eigentliche, bisher unbekannte Funktion des Exporters essentiell ist und im Lauf der Evolution die Substratspezifität verloren ging.

Für die mikrobielle Produktion einer Aminosäure ist grundsätzlich neben der Biosynthese der Export relevant. Insbesondere für die Isoleucinbildung mit *C. glutamicum* ist bekannt, dass während der Kultivierung von Produktionsstämmen Isoleucin und dessen unmittelbare Vorstufe α -Ketomethylvalerat zellintern um ca. das zweifache akkumulierten. In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss des Exporters in dem nur wenig Isoleucin produzierenden Stamm *C. glutamicum* DM368-2 untersucht. Durch Überexpression von *brnFE* akkumuliert dieser Stamm extern mehr Isoleucin, wodurch sich eine Produktsteigerung von bis

zu 37 % ergibt. Damit ist gezeigt, dass durch gesteigerte *bmFE*-Expression generell auch die Produktion von L-Isoleucin verbessert werden kann. In *C. glutamicum* konnte eine Verbesserung der Threoninakkumulation durch Überexpression des Threoninexportergens *thrE* von bis zu 40 % erreicht werden (P. Simic, Dissertation, 2000). Auch die heterologe Überexpression von *thrE* in threoninproduzierenden *E. coli* Stämmen wirkte sich positiv auf die Produktbildung aus (Kruse *et al.*, 2002). Bei der Produktion von L-Lysin mit *C. glutamicum* wurde eine verstärkte Lysinexkretion vermutet, die durch eine Mutation im Lysinexportergen bedingt sein könnte (Broer *et al.*, 1993). Die Sequenzierung verschiedener *lysE*-Allele von Produktionsstämmen widerlegte dieser Hypothese jedoch, da die Sequenzen mit der des Wildtyps identisch waren (M. Vrljic, Dissertation, 1997). Bei dem Vergleich von *C. glutamicum* 13032 mit dem Lysinproduzierendem Stamm B-6 zeigten sich keine Mutationen im *lysE*- oder *lysG*-Gen, was auch eine Beteiligung des Regulators LysG an verbesserten Exkretionseigenschaften ausschließt (Ohnishi *et al.*, 2001). Diese Hinweise lassen vermuten, dass die Produktion von L-Lysin nicht durch den aktiven Export limitiert ist. Durch Überexpression der Exportergene *bmFE* in Isoleucinproduktionsstämmen konnte tendenziell eine Produktsteigerung erreicht werden. Durch die nun vorliegenden Produktionsstämme, in denen die Exportergene überexprimiert und der Importer deletiert ist, sollte nach einer Optimierung der Fermentationstechnik eine Steigerung der Produktbildung möglich sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Da L-Isoleucin als essentielle Aminosäure für Mensch und Tier von großer Bedeutung ist, wurde in den letzten Jahren versucht, diese Aminosäure mit dem Bakterium *Corynebacterium glutamicum* zu produzieren. Dabei haben stoffwechselphysiologische Untersuchungen gezeigt, dass dieser Mikroorganismus einen aktiven Exportcarrier für die Sekretion von L-Isoleucin ins Medium besitzt. Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit, das Gen für diesen Carrier zu klonieren und seine Eigenschaften zu untersuchen.

- I. Um das Gen des Isoleucinexportcarriers in *C. glutamicum* zu identifizieren, wurde zunächst eine im Export defekte Transposonmutante isoliert. Die Klonierung und Sequenzierung der Insertionsorte des Transposons ergab ein aus drei Genen bestehenden Gencluster.
- II. Zwei dieser Gene kodieren für stark hydrophobe Proteine, wobei eines ein Molekulargewicht von 27,3 kDa und vermutlich sieben transmembrane Helices besitzt und das andere 11,5 kDa schwer ist und vermutlich vier Helices hat. Benachbart zu den Genen ist in divergenter Orientierung das Gen eines möglichen Regulators (*Irp*) lokalisiert.
- III. Zur Untersuchung der Funktion dieser Gene wurden verschiedene Mutanten hergestellt und durch Bestimmung der Exportrate charakterisiert. Es zeigte sich, dass der aktive Export von L-Isoleucin in der Deletionsmutante nicht mehr nachweisbar ist. Durch die Überexpression der Gene wird die Exportrate auf $7,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Tg}$ gesteigert. Der Export von L-Isoleucin ist nur in Anwesenheit beider Gene möglich. Auch das Gen des möglichen Regulators ist für den Export von L-Isoleucin essentiell. Der Export von L-Leucin und L-Valin wird ebenfalls durch diesen Carrier katalysiert.
- IV. Aufgrund der Funktion dieser Proteine als Exportercarrier der verzweigt-kettigen Aminosäuren wurden diese mit BrnFE für *branched chain amino acid export* bezeichnet. Durch Datenbankanalysen wurden zu BrnF und BrnE homologe Proteine mit identischer genomischer Organisation in mehr als 25 Prokaryonten identifiziert, die nun als LIV-E Transporterfamilie zusammengefasst werden. Interessanterweise wurde in *C. glutamicum* ein zu BrnFE paraloges System identifiziert, dessen Funktion zur Zeit noch nicht geklärt ist.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, S., Takayama, K.-I. and Kinoshita, S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301
- Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P. N., Taylor, S., Vazquez, N. and Neyfakh, A. (1995).** Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* **177**: 3904-3910
- Alexeyev, M. and Winkler, H. (1999).** Membrane topology of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADP translocase revealed by novel dual *pho-lac* reporters. *J. Mol. Biol.* **285**: 1503-13
- Altschul, Stephen F., et al. (1997).** Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402
- Ankri, S., Serebrijski, I., Reyes, O. and Leblon, G. (1996).** Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the *proA* step. *J. Bacteriol.* **178**: 4412-4419
- Argoudelis, A. D., Herr, R. R., Mason, D. J., Pyke, T. R. and Zieserl, J. F. (1967).** New Amino Acids from Streptomyces. *Biochemistry* **6**: 165-170
- Barnes, W. M. (1994).** PCR amplification of up to 35-kb with high fidelity and high yield from λ bacteriophage template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2216-2220
- Bathe, B., Kalinowski, J. and Pühler, A. (1996).** A physical and genetic map of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 255-265
- Belitsky, B. R., Gustafsson, M. C. U., Sonnenshein, A. L. and von Wachenfeldt, C. (1997).** An *lrp*-Like Gene of *Bacillus subtilis* Involved in Branched-Chain Amino Acid Transport. *J. Bacteriol.* **179**(17): 5448-457
- Bellmann, A., Vrljic, M., Patek, M., Sahm, H. and Eggeling, L. (2001).** Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **147**:1764-74
- Benz, R. and McLaughlin, S. (1983).** The molecular mechanism of action of proton ionophore FCCP (carbonylcyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon). *J. Biophys.* **41**: 381-98
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C. (1984).** A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**: 175-179.
- Blattner, F. R., Plunkett III., G., Bloch, C. A., et al., 1997.** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**: 1453-1474
- Boles, E., Ebbighausen, H., Eikmanns, B. and Krämer, R. (1993).** Dual regulation of the uptake system for branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **159**: 147-52

- Bost, S., Silva, F. and Belin, D. (1999).** Transcriptional activation of *ydeA*, which encodes a member of the major facilitator superfamily, interferes with arabinose accumulation and induction of the *Escherichia coli* arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* **181**: 2185-91
- Bralley P, Jones G. H. (2001).** Poly(A) polymerase activity and RNA polyadenylation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **40(5)**:1155-64
- Bramucci, M. G. and Nagarajan, V. 1996.** Direct deletion of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on saccharose-induced lethality. *Appl. Environmental. Microbiol.* **62(11)**: 3948-53
- Cashel, M. and Rudd, K. E. (1987).** The Stringent Response 1410-1435 in: Neidhardt, F. C., Curtiss, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, USA.
- Chang, G. and Roth, C. B. (2001).** Structure of MsbA from *Escherichia coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**: 1793-1800
- Chung, Y. J. and Saier Jr., M. H. (2001).** SMR-type multi drug resistance pumps. *Curr. Opin. Drug Dis. Dev.* **4**:237-245
- Condemine, G. (2000).** Characterization of SotA and SotB, two *Erwinia chrysanthemi* proteins which modify isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside and lactose induction for *Escherichia coli* *lac* promoter. *J. Bacteriol.* **182**: 1340-45
- Cordes, C., Möckel, B., Eggeling, L. and Sahm, H. (1992).** Cloning and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **112**: 113-116
- Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H. (1990).** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 478-480
- Crupper, S. S., Worrell, V., Stewart, G. C. and landolo, J. J. (1999).** Cloning and expression of *cadD*, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181(13)**: 4071-75
- Dassler, T., Maier, T, Winterhalter, C. and Böck, A. (2000).** Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in Efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol. Microbiol.* **36**: 1101-12
- DeChavigny, A., Heacock, P. N. and Dowhan, W. (1990).** Sequence and inactivation of *pss* gene of *Escherichia coli*. *J. Biolog.Chem.* **266**: 5323-32
- Deppenmeier, U., Gottschalk, G, et al. (2002).** The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4(4)**: 453-61
- Dover N, and Padan E. (2001).** Transcription of *nhaA*, the main Na(+)/H(+) antiporter of *Escherichia coli*, is regulated by Na(+) and growth phase. *J. Bacteriol.* **183(2)**:644-53

- Dunican, L. K. and Shirvnan, E. (1989).** High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Biotechnology* **7**: 1067-70
- Ebbighausen, H., Weil, B. and Krämer, R. (1989a).** Isoleucin excretion in *Corynebacterium glutamicum*: Evidence for a specific efflux carrier system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 184-90
- Ebbighausen, H., Weil, B. and Krämer, R. (1989b).** Transport of branched chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 238-44
- Eggeling, I., Cordes, C., Eggeling, L. and Sahm (1987).** Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of α -ketobutyrate to L-isoleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 346-51
- Eggeling L. (1994).** Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* **6**: 261-72
- Eggeling, L., Morbach, S. and Sahm, H. (1997).** The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnology* **56**: 167-82
- Eggeling, L. and Sahm, H. (1999).** L-Glutamate and L-Lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-53
- Eggeling, L., Krumbach, K. and Sahm, H. (2001).** L-Glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: Why is penicillin treatment or tween addition doing the same. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**(1): 67-68
- Eggeling, L., Pfefferle, W. and Sahm, H. (2001b).** Amino Acids. In: *Basic Biotechnology*. 2nd Ed., pp.281-303, Ratledge, C. and Kristiansen, B. (Eds.). *Cambridge University Press, Cambridge, UK*.
- Eggeling, L. and Sahm, H. (2001).** The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioengin.* **92**(3): 201-13
- Eiglmeier, K., Honore, N., Woods, S. A., Caudron, B. and Cole, S. T. (1993).** Use of an ordered cosmid library to deduce the genomic organization of *Mycobacterium leprae*. *Mol. Microbiol.* **7** (2): 197-206
- Eikmanns, B., Kleinertz, E., Liebl, W. and Sahm, H. (1991a).** A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for gene cloning, controlled gene expression, and promotor probing. *Gene* **102**: 93-98
- Eikmanns, B., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M. and Sahm, H. (1991b).** Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 617-22
- Eikmanns, B. J., Eggeling, L. and Sahm, H. (1993).** Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 145-63
- Eikmanns, B. J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K. and Sahm, H. (1994)** Nucleotid sequence, expression and transcriptional analysis of *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**: 1817-28

- Erdmann, A., Weil, B. and Krämer, R. (1993).** Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 3115-22
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. and Poole, K. (1998).** Influence of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**(20): 5443-47
- Follettie, M. T., Shin, H. K. and Sinskey, A. J. (1988).** Organisation and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* locus. *Mol. Microbiol.* **2**: 53-62
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Schiwara, H. W. and Boesken, W. H. (1985).** Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient-gels for the analysis of urinary proteins. *Science Tools*, 32
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. and Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-49
- Griegorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M. and Henderson, R. (1996).** Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **259**: 393-421
- Guder A, Wiedemann I, Sahl HG. (2000).** Posttranslationally modified bacteriocins-the lantibiotics. *Biopolymers* **55**: 62-73
- Guergova-Kuras, M., Salcedo-Hernandez, R., Bechmann, G., Kuras, R., Gennis, R. B. and Crofts, A. R. (1999).** Expression and one-step purification of a fully active polyhistidine -tagged cytochrome bc1 complex. *Protein Expression and Purification* **15**: 370-80
- Guillouet, S., Rodal, A. A., An, G-H., Gorret, N., Lessard, P. A. and Sinskey, A. J. (2001).** Metabolic redirection of carbon flow toward isoleucine by expressing a catabolic threonine dehydratase in a threonine-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 667-73
- Gutmann, M. (1993).** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Haier, B. (2000).** Funktionelle Analyse des Lysinexportcarriers aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität zu Köln.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-80
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *Escherichia coli*; pp. 109-136; in: Glover, D.M. (Ed.); DNA cloning, Vol. 1, IRL Press, Oxford
- Haney, S.A., Platko, J., Oxender, D.L. and Calvo, J. M. (1992).** Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 108-15
- Hashiguchi, K., Takesada, H., Suzuki, E. and Matsui, H. (1999).** Construction of an L-isoleucine overproducing strain of *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**(4): 672-79

- Haynes, J. A. and Britz, M. L. (1989).** Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**: 329-34
- Haynes, J. A. and Britz, M. L. (1990).** The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 255-63
- Henderson, P. J. F. (1998).** Function and structure of membrane transport proteins. in The transporter facts book. Griffith, J. and Sansom, C. *Academic Press*.
- Hermann, T. (1998).** Untersuchungen zum Transport von Isoleucin bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Hermann, T. and Krämer, R. (1996).** Mechanism and Regulation of isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(9)**: 3238-44
- Hoischen, C. and Krämer, R. (1989).** Evidence for an efflux carrier system involved in secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 342-47
- Hoischen, C. and Krämer, R. (1990).** Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172(6)**: 3409-16
- Hoppe, B. und Martens, J. (1983).** Aminosäure-Herstellung und Gewinnung. *Chemie unserer Zeit* **18**: 73-78
- Hosie, A. H. F. and Poole, P. S. (2001).** Bacterial ABC transporters of amino acids. *Res. Microbiol.* **152**: 259-70
- Hosie, A. H. F., Allaway, D., Jones, M. A., Walshaw, D. L., Johnston, A. W. B. and Poole, P. S. (2001).** Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Mol. Microbiol.* **40(6)**: 1449-59
- Hu, L. A. and King, S., C. (1998).** Membrane topology of the *Escherichia coli* gamma-aminobutyrate transporter: implications on the topography and mechanism of procaryotic and eucaryotic transporters from the APC superfamily. *Biochem. J.* **223**: 69-76
- Ingraham, J. L., Maaloe, O. and Neidhardt, F. C. (1983).** Growth of the bacterial cell. 155-63, Sinauer, Sunderland, Mass., USA
- Inoue, H., Noumi, T., Tsuchiya, T. and Kanazawa, H. (1995).** Essential aspartic acid residues, Asp-133, Asp-163 and Asp-164 in the transmembrane helices of a Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **363**: 264-68
- Jack, D. L., Yang, N. M. and Saier Jr., M. H. (2001).** The drug/ metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3620-39
- Jäger, W., Kalinowski, J. and Pühler, A. (1997).** A *Corynebacterium glutamicum* gene conferring multidrug resistance in the heterologous host *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183(2)**: 644-53
- Javadour, M. M., Eilers, M., Groesbeek, M. and Smith, S. O. (1999).** Helix packing in polytopic membrane proteins: Role of glycine in transmembrane helix association. *Biophys. J.* **77**: 1609-18

- Jetten, M. S. M. and Sinskey, A. J. (1995).** Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**: 73-103
- Jones, B. M. and Gilligan, J. P. (1983).** o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatography* **266**: 471-82
- Juillard, V., LeBars, D., Kunji, E. R. S., Konings, W. N., Gripon, J. and Rochard, J. (1995).** Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth on milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3024-30
- Kaback, H. R., Frillingos, S., Jung, H., Prive, G. G., Ujwal, M. L. Weitzmann, C., Wu, J. and Zen, K. (1994).** The lactose permease meets Frankenstein. *J. Exp. Biol.* **196**: 183-195
- Keddie, R. M. and Cure, G. L. (1977).** The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. *J. Appl. Bacteriol.* **42**: 229-52
- Keilhauer, C., Eggeling, L. and Sahm, H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* Operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-603
- Kennerknecht, N., Sahm, H., Yen, M.-R., Patek, M., Saier Jr., M. H. and Eggeling, L. (2002).** Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J. Bacteriol.* **184(14)**: 3947-56
- Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation, production of L-glutamic acid by various microorganism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205
- Kinoshita, S. (1985).** Glutamic acid bacteria. 115-142 In: Demain, A. L. and Solomon (Eds.). Biology of industrial microorganisms. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, London, U.K.*
- Kisumi, M., Sugiura, M., Kata, J. and Chibata, I. (1976).** Biosynthesis of norvaline, norleucine, and homoisoleucine in *Serratia marcescens*. *J. Biochem.* **80(2)**: 333-9
- Kisumi, M., Sugiura, M., Kata, J. and Chibata, I. (1976a).** L-Norvaline and homoisoleucine formation by *Serratia marcescens*. *J. Biochem.* **79**: 1021-1028
- Kircher, M. and Pfefferle, W. (2001).** The fermentative production of L-lysine as an animal feed additive. *Chemosphere* **43(1)**: 27-31
- Klingenberg, M. and Pfaff, E. (1977).** Means of terminating reactions. *Methods Enzymol.* **10**: 680-84
- Klingenberg, M., Echter, K. S. (2001).** Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. *Biochim. Biophys. Acta* **1504(1)**: 128-43
- Klyachko, K. and Neyfakh, A. (1998).** Paradoxical enhancement of the activity of a bacterial multidrug transporter caused by substitutions of a conserved residue. *J. Bacteriol.* **180(11)**: 2817-21

- Krämer, R. (1994).** Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **162**: 1-13
- Krämer, R. (1994a).** Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 75-94
- Kruijff de, B. (1997).** Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr. Op. Chem. Biol.* **1**: 564-69
- Kruse, D., Krämer, R., Eggeling, L., Rieping, M., Pfefferle, W., Tchieu, J. H., Chung, Y. J., Saier Jr., M.H. and Burkovski, A. (2002).** Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 205-10
- Laoli, M. (1999).** Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell.Mol.Life Sci.* **56**: 918 -44
- Leuchtenberger, W. (1996)** Amino acids - technical production and use. In: Rehm, H. J. and Reed, G. (Eds.), Products of primary metabolism, *Biotechnology* **6**: 455-502
- Link, A. J., Phillips, D. and Church, G. M. (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**: 6228-37
- Liu, J. Y., Miller, P. F., Gosink, M. and Olson, E. R.. (1999a).** The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **227**: 22977-84
- Liu, J. Y., Miller, P. F., Willard, J. and Olson, E. R. (1999b).** Functional and biochemical characterization of *Escherichia coli* sugar efflux pumps. *J. Biol. Chem.* **31**: 1845-51
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. and Schleifer, K.H. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 299-304
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1991).** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297^T, „*Brevibacterium flavum*“ DSM20411, „*Brevibacterium lactofermentum*“ DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 255-60
- Lindroth, P. and Mopper, K. (1979).** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1167-74
- Lukat, G. S., Stock, A. M. and Stock, J. B. (1990).** Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **29**: 5436-42
- Masaoka, Y., Ueno, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. (2000).** A two-component multidrug efflux pump, EbrAB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**: 2307-10
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. and Sahm, H. (1989).** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *App. Environ. Microbiol.* **55**: 684-88
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Miller, P. F. and Sulavic, M. C. (1996).** Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21(3)**:441-448
- Milner, J. L., Vomk, B. and Wood, J. M. (1987).** Transmembrane amino acid flux in bacterial cells. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **5**: 1-48
- Möckel, B., Eggeling, L. and Sahm, H. (1994).** Threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* with altered allosteric control: their generation and biochemical and structural analysis. *Mol. Microbiol.* **13**: 833-42
- Morbach, S., Sahm, H. and Eggeling, L. (1996).** L-isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*: Further flux increase and limitation of export. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4354-51
- Morbach, S. (1997).** Bildung von L-Isoleucin mit *Corynebacterium glutamicum* und Analysen zur Genregulation des *ilvBNC*-Operons. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Morbach, S., Junger, C., Sahm, H. and Eggeling, L. (2000).** Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: Evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site. *J. BioScience and Bioengineen.* **90(5)**: 501-7
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. (2002).** Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature.* **419**: 587-93
- Muth T. R., Schuldiner S. (2000).** A membrane-embedded glutamate is required for ligand binding to the multidrug transporter EmrE. *EMBO. J.* **19(2)**: 234-40
- Newman, E. B., Lin, R. T. and D'Ari, R. (1987).** The Leucine/Lrp Regulon. 1513-1527 In: Neidhardt, F. C., Curtiss, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (Eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology. *American Society for Microbiology, USA.*
- Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E., and Chen, L. B. (1991).** Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1450-52
- Neyfakh, A. A. (2002).** Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol. Microbiol.* **44(5)**: 1123-30
- Niebisch, A. and Bott, M. (2001).** Molecular analysis of the cytochrome bc1-aa3 branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome c1. *Arch. Microbiol.* **75(4)**:282-94
- Nikaido, H. and Saier jr, M. H.(1992).** Transport proteins in bacteria: Common themes in their design. *Science* **258**: 936-42
- Nishino, K. and Yamaguchi, A. (2001).** Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **183(20)**: 5803-121

- Normark S., Bergstrom S., Edlund T., Grundstrom T., Jaurin B., Lindberg F. P., Olsson O. (1983).** Overlapping genes. *Annu. Rev. Genet.* **17**: 499-525.
- Norlander, J. M., Kempe, T. and Messing, J. (1983).** Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**: 101-6
- Oguiza, J. A., Malumbres, M., Eriani, G., Pisabarro, A., Mateos, L. M., Martin, F. and Martín, J. F. (1993).** A gene encoding Arginyl-tRNA synthetase is located in the upstream region of the *lysA* gene in *Brevibacterium lactofermentum*: Regulation of *argS-lysA* cluster expression by arginine. *J. Bacteriol.* **175(22)**:7356-62
- Ohnishi K., Matsubara K., Hattori Y., Sadanari H., Yamada R. and Fukuda S. (1999).** Identification of a cis-acting regulatory sequence responsible for the repression of *brnQ* in *Salmonella typhimurium*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1445**:196-206
- Ohnishi J., Matsubashi S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochia, K. and Ikeda, M. (2001).** A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 217-23
- Palmer, B. R. and Marinus, M. G., (1994).** The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*: a review. *Gene* **143(1)**:1-12
- Palmieri, L., Berns, D., Krämer, R. and Eikamanns, M. (1996).** Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch. Microbiol.* **165**: 48-54
- Patek, M., Krumbach, K., Eggeling, L. and Sahm, H. (1994).** Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme activities, structure of *leuA*, and effect of *leuA* inactivation on lysine synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(1)**: 133-40
- Pao, S. S., Paulssen, I. and Saier Jr., M. H. (1998).** Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 48-54
- Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A. (1996).** Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60(4)**:575-608
- Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saier Jr., M. H., Turner, R. J., Wiener, J.H., et al. (1996a).** The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* **19**: 1167-75
- Payne, J. W. and Bell, G. (1979).** Direct determination of the properties of peptide transport systems in *Escherichia coli*, using a fluorescent-labelling procedure. *J. Bacteriol.* **137**: 447-455
- Payne and Smith (1994).** Peptide transport in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* Vol. 36.
- Porath, J., Carlson, J., Olsson, I. and Belfrage, G. (1975).** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.* **258**: 598-9
- Putmann, M., Veen van, H. W. and Koning, W. N. (2000).** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* **64(4)**: 672-93

- Radmacher, E., Vaitsikova, A., Burger, U., Krumbach, K., Sahm, H., Eggeling, L. (2002).** Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(5)**:2246-50
- Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J. and Sahm, H. (1991).** Analysis of a *Corynebacterium glutamicum* *hom* gene coding for feedback-resistant homoserine dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **173**: 3228-30
- Reinscheid, D. J., Kronemeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B. J. and Sahm, H. (1994).** Stable expression of *hom-1thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 126-32
- Rest van der, M. E., Lange, C. und Molenaar, D. (1999).** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* xenogenic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-5
- Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P. and Sander, C. (1995).** Transmembrane helices prediction at 95 % accuracy. *Protein Science* **4**: 521-33
- Rosenberg, M. F., Velarde, G., Ford, R. C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I. D., et al. (2001).** Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.* **20**: 5615-25
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B. and Krämer, R. (1995).** Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 243-52
- Saier Jr., M. H. (1994).** Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis and evolution. *Microbiol. Rev.* **58**: 71-93
- Saier Jr., M. H. (2000).** Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J. Bacteriol.* **182**: 5029-35
- Saier Jr., M. H. (2000a).** A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64(2)**: 354-411
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higushi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Ehrlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **23**: 487-91
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a Laboratory manual, 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Saenz, H. L., Augsburg, V., Vuong, C., Jack, R. W., Götz, F. and Otto, M. (2000).** Inducible expression and cellular location of AgrB a protein involved in maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch. Microbiol.* **174**: 452-55
- Sanger, F., Nicklen, C. and Coulson, A.R. (1977).** DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-67
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H. and Pühler, A. (1990).** High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663-66

- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73
- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V.D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T. and Bott, M. (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis*. **22**:4404-22
- Schaffitzel C, Berg M, Dimroth P, Pos KM (1998).** Identification of an Na⁺-dependent malonate transporter of *Malonomonas rubra* and its dependence on two separate genes. *J. Bacteriol.* **180**(10): 2689-93
- Schlichtman, D., Kubo, M., Shankar, S. and Chakrabarty, A. M. (1995).** Regulation of nucleoside diphosphate kinase and secreted virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of *algR* and *algH*. *J. Bacteriol.* **177**(9): 2469-74
- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Eggeling, L. and Sahm, H. (1991).** A functionally split pathway for Lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **173**(14): 4510-16
- Schrumpf, B., Eggeling, L. and Sahm, H. (1992).** Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-71
- Schwarzer, A. and Pühler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology* **9**: 84-7
- Simic, P., Sahm, H. and Eggeling, L. (2001).** L-Threonine export: Use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **183**(18): 5317-24
- Smith, P. K. et al. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-17
- Stackerbrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchical classification system Actinobacteria classis nov. *J. Bacteriol.* **47**(2): 479-91
- Tani, T. H., Khoudursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P. O. and Matthews, R. G. (2002).** Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**(21): 13471-76
- Tauch, A., Hermann, T., Burkovski, A., Krämer, R., Pühler, A. and Kalinowski, J. (1998).** Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 is directed by the *brnQ* gene product. *Arch. Microbiol.* **169**: 303-12
- Tilg, Y. (2002).** Lipidsynthese in *Corynebacterium glutamicum*: Genetische und biochemische Untersuchungen zu Acyl-CoA Carboxylasen. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Tindall, K. R. and Kunkel, T. A. (1988).** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-13

- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-82
- Tomb, J.-F., White, O. and Kerlage, A.R., et al. (1997).** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-47
- Uratani, Y., Kobayashi, M., Yokoyama, Y., Maeda, T., Mitaku, S. and Hoshino, T. (1999).** Phospholipids stabilize the secondary structure of the sodium-coupled branched-chain amino acid carrier of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. et Biophys. Acta* **1435**: 71-81
- Vasikova, P. Z., Abrhamaova, J., Nesvera, M., Patek, M., Sahm, H. and Eikmanns, B. (1998).** Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotech. Tech.* **12**: 742-46
- Vrljic, M., Sahm, H. and Eggeling, L. (1996).** A new type of transporter with a new type of cellular function: L-Lysin export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**(5): 815-26.
- Vrljic, M., Kronemeyer, W., Sahm, H. and Eggeling, L. (1995).** Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. *J. Bacteriol.* **177**(14): 4021-27
- Vrljic, M. (1997).** L-Lysinexport bei *Corynebacterium glutamicum*: Physiologische und molekularbiologische Charakterisierung des Carrier-vermittelten Exportes eines Primärmetaboliten. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Vrljic, M., Garg, J., Bellmann, A., Wachi, S., Freudl, R., Malecki, M. J., Sahm, H., Kozina, V. J., Eggeling, L. and Milton Jr., M. H. (1999).** The LysE-superfamily: topology of the Lysin exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 327-36
- Wilcken-Bergmann von, B., Tils D., Sartorius J., Auerswald E. A., Schroder W. and Muller-Hill B. (1986).** A synthetic operon containing 14 bovine pancreatic trypsin inhibitor genes is expressed in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5**(12): 3219-25
- Wolf, H., Pühler, A. and Neumann, E. (1989).** Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 283-289
- Woodruff, H. B. (1981).** A soil microbiologist's odyssey. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 1-28
- Xiong, J., Inoue, K. and Bauer, C. E. (1998).** Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (25): 14851-56
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-19
- Yen M. R., Tseng Y. H., Simic P., Sahm H., Eggeling L. and Saier Jr., M. H. (2002).** The ubiquitous ThrE family of putative transmembrane amino acid efflux transporters. *Res. Microbiol.* **153**(1):19-25

Zakataeva, N. P., Aleshin, V. V., Tokomakova, I. L., Troshin, P. V. and Livshits, V. A. (1999). The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* **452**: 228-32

Zhai, Y. and Saier Jr., M. H. (2001). A web-based program for the prediction of average hydropathy, average amphipathy and average similarity of multiply aligned homologous proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3(2)**: 285-86

Ziegler, P. (2000). Untersuchungen zur Sekretion und zum Abbau von L-Threonin in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Zittrich, S. and Krämer, R. (1994). Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion. *J. Bacteriol.* **176**: 6892-99

VI. ANHANG

1 Oligonukleotidsequenzen

Tab. 19: Oligonukleotidsequenzen, die zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, oder zur Sequenzierung verwendet wurden.

Primer	Oligonukleotid	Schnittstelle/ Verwendung
RSP	5'-[CACAGGAAACAGCTATGACCATG]-3'	reverser Universal-M13-Primer
USP	5'-[CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC]-3'	forward Universal-M13-Primer
Sequenzierungs- primer		
<i>EcoRI</i> -Tn-Primer	5'-[CGGGTCTACACCGCTAGCCCAGG]-3'	Zur Ansequenzierung klonierter <i>Tn5531</i> Insertionsorte.
<i>XbaI</i> -Tn-Primer	5'-[CGGTGCCTTATCCATTCAGG]-3'	
810-51-F1	5'-[CAATACCAATCGGGTACATGC]-3'	Verlängerung bei pUC18Klon1-8 <i>EcoRI</i> :
810-52-F2	5'-[TGTTTCGCATCGGCGTTGCTG]-3'	Verlängerung bei pUC18Klon1-8 <i>EcoRI</i> :
810-79-F1	5'-[CAACGTTTCGCAGCAATGTG]-3'	Verlängerung bei pUC18-Klon1-8 <i>PstI</i>
810-112-F1	5'-[CAATGGTGAAGCTCAAACCTG]-3'	Vollständige Sequenzierung von pUC18 <i>azlCDIrp</i>
810-112-F2	5'-[CAATACCAATCGGGTACATG]-3'	
810-112-F3	5'-[CAGCGTTTGGGAAGCCGAAG]-3'	
810-112-R1	5'-[CGATCAATGGAATCTAGCTTC]-3'	
810-112-R2	5'-[CTCAATGCAAATAGCGTTTCAC]-3'	
810-112-R3	5'-[GCAAAATGGCGATGTGGATG]-3'	
810-233-R1	5'-[GATACTGACGGGCTCCAG]-3'	Vollständige Sequenzierung des <i>lacZ</i> -Gens
810-233-R2	5'-[TGCGGGTCGCTTCACTTACG]-3'	
810-233-R3	5'-[AGACCGTTCATACAGAAGT]-3'	
810-233-R4	5'-[GCGGATGGTTCGGATAATGC]-3'	
810-233-R5	5'-[ACATGGAAATCGCTGATTTG]-3'	
810-233-R6	5'-[GAAGATCGCACTCCAGCCAG]-3'	

Tab. 19 (ff): Oligonukleotidsequenzen

810-222-P1	5´-[CTTCAAATTGAGGGCATG]-3´	Kontrollprimer zur Sequenzierung von <i>brnFE</i> pJC1- forward Primer pEM1-forward Primer
810-222-P2	5´-[CAGCCAGTGCGAGATTTG]-3´	
810-163-R	5´-[CGCAGAAAGTGGTCCTGCAAC]-3´	
810-240-P1	5´-[TGTGGAATATCTACCGACTG]-3´	
PCR-Primer		
Primer A:	5´-[CGGAATTC GAGTCCCAATGCGTTTCAAGTCA]-3´	Primer zur Herstellung des downstream Bereichs des <i>brnFE</i> -Deletionsfragmentes (<i>EcoRI</i>)
Primer B:	5´-[CCCATCCACTAAACTTAAACA TGCCGTTGCGATTACAGTGGTC]-3´	
Primer C:	5´-[TGTTTAAAGTTTAGTGGATGGG CCAGGCTTGAATGAATCTCCTGC]-3´	Herstellung des upstream Bereichs des <i>brnFE</i> - oder <i>brnF</i> -Deletionsfragmentes (<i>XbaI</i>)
Primer D:	5´-[GCTCTAGA GTCTACAGTGGAGCGGTCGAAGT]-3´	
Primer E	5´-[CCCATCCACTAAACTTAAACA CTGATCTTCTTGGGTCTGTTGAC]-3´	Herstellung des downstream <i>brnF</i> -Deletionsfragmentes (<i>EcoRI</i>)
Primer F	5´-[GCGAATTC GATTCACCAGTCCAACAAAAACG]-3´	
P-up-for- <i>brnQ</i>	5´-[GCCGATGTGAAGGCCTGGAAG]-3´	Primer zur Herstellung des upstream <i>brnQ</i> -Deletionsfragmentes
P-up-rev- <i>brnQ</i>	5´-[CCCATCCACTAAACTTAAACA CAGCATCAAAGAAGTAATCAGGAC]-3´	
P-down-for- <i>brnQ</i>	5´-[TGTTTAAAGTTTAGTGGATGGG GAATCCATTTCCGTCTAATCGCTA]-3´	Primer zur Herstellung des downstream <i>brnQ</i> -Deletionsfragmentes
P-down-rev- <i>brnQ</i>	5´-[CGATGCGGTCTGGGTACAAC]-3´	
upper- <i>brnFE</i>	5´-[GCTCTAGA ACCTTGTCAGCCAGTGCGAGAT]-3´	<i>XbaI</i> / Amplifizierung von <i>brnFE</i>
lower- <i>brnFE</i>	5´-[GCTCTAGA AAAAATCCGCATCCCCTTCA]-3´	
<i>brnF</i> -lower	5´-[GCTCTAGA GCCCCGAGCGCAAAAGTAAT]-3´	<i>XbaI</i> / Amplifizierung von <i>brnF</i>
<i>brnE</i> -upper	5´-[ATTCATTCAAGCCTGGAGGTGTCTG]-3´	Amplifizierung von <i>brnE</i>
<i>brnE</i> -lower	5´-[AGCGCTGTCTGCTTAAGCCTTTTC]-3´	

Tab. 19 (ff): Oligonukleotidsequenzen

p1-77rev	5´-[TTGCGGGAGCTGCTGAGAAGTAAG]-3´	Zur Amplifizierung des intergenischen Fragments von <i>cmr</i> und <i>clpB</i>
p1-77for	5´-[CAAGGCCGGACCGTGGATT]-3´	
p1-25Ecofor	5´-[GGCCCAATCGCAAACGGCACTG]-3´	Zur Amplifizierung eines internen <i>htaA</i> Fragments
p1-25Ecorev	5´-[CGTCGAATTGACGGTTGGGTTGG]-3´	

2 Plasmidkarten

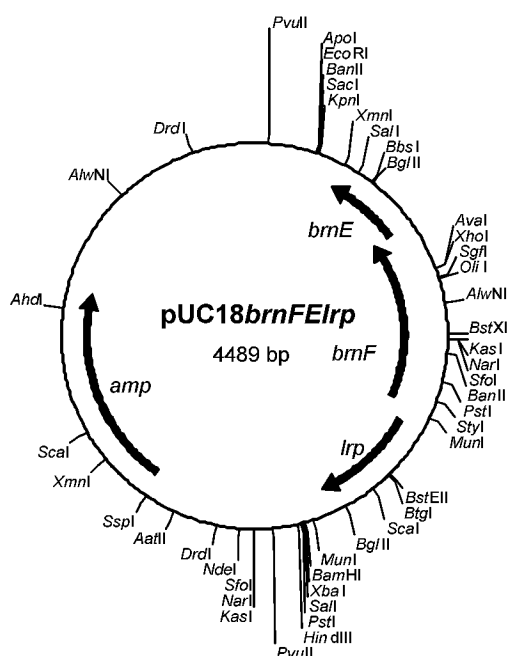


Abb. 31: pUC18brnFEIrp: pUC18 mit einem 1,8 kb PCR-Fragment von *brnFE* und *Irp*.

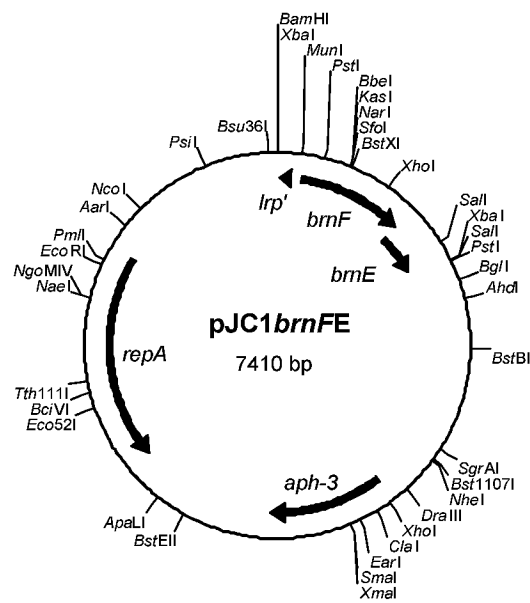


Abb. 32: pJC1brnFE: pJC1 mit einem 1,3 kb Fragment von *brnFE*.

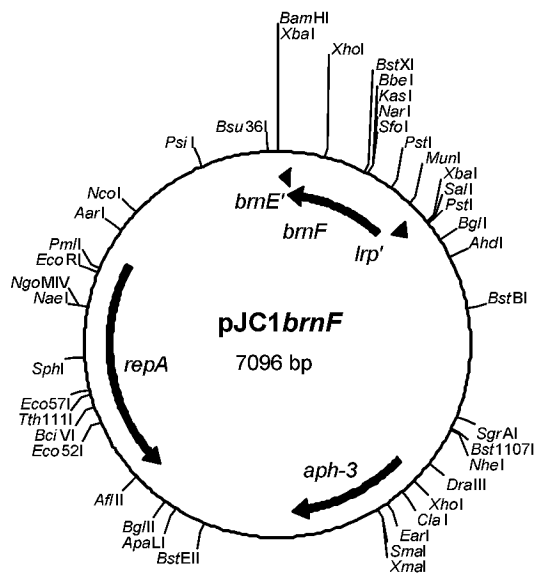


Abb. 33: pJC1brnF: pJC1 mit einem ca. 1 kb Fragment von *brnF*.

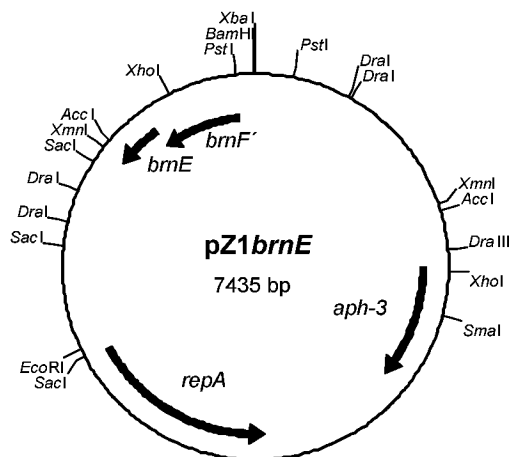


Abb. 34: pZ1brnE: pZ1 mit einem 1,2 kb Fragment von *brnE*.

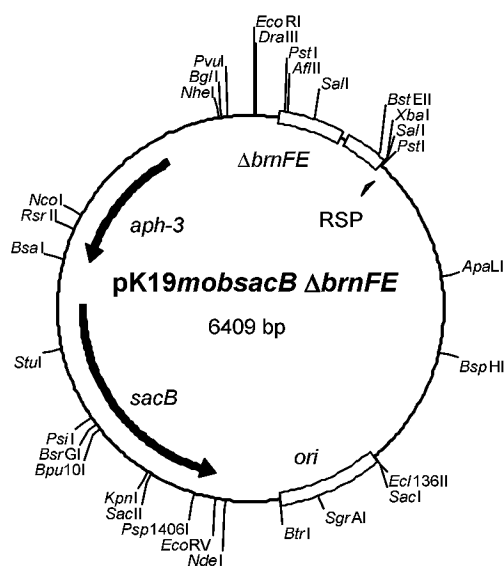


Abb. 35: pK19mobsacB Δ brnFE: pK19mobsacB mit einem um 942 nt deletierten *brnFE*-Fragment.

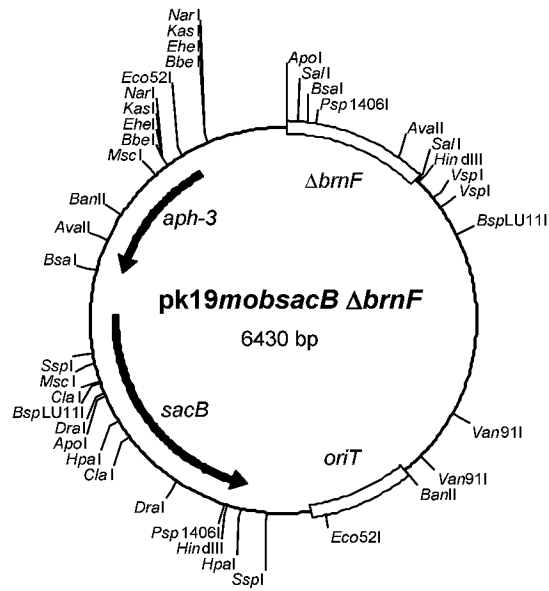


Abb. 36: pK19mobsacB Δ brnF: pK19mobsacB mit einem um 642 nt deletierten *brnF*-Fragment.

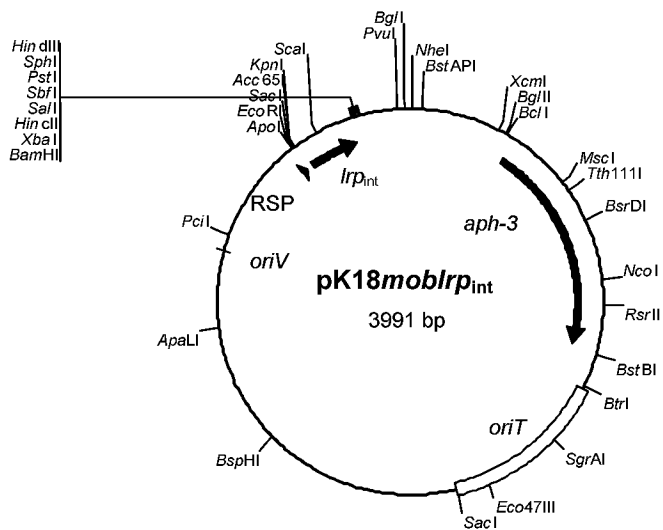


Abb. 37: pK18moblrp_{int}: pK18mob mit einem 203 nt internen *lrp* Fragment.

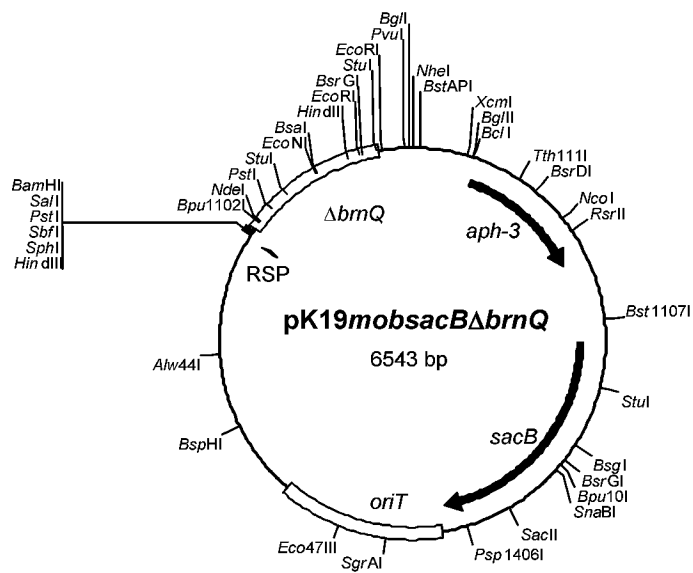


Abb. 38: pK19mobsacBΔbrnQ: pK19mobsacB mit einem um 1224 nt deletierten brnQ-Fragment.

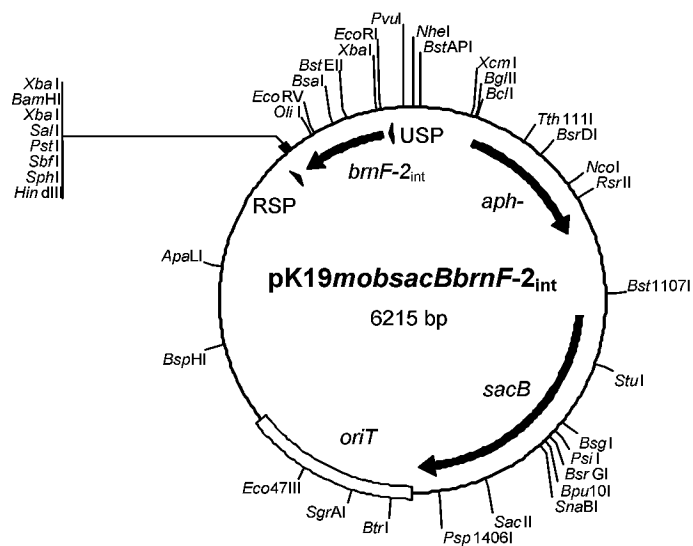


Abb. 39: pK19mobsacB brnF_{2int}: pK19mobsacB mit einem internen, 506 nt großen brnF-2 Fragment.

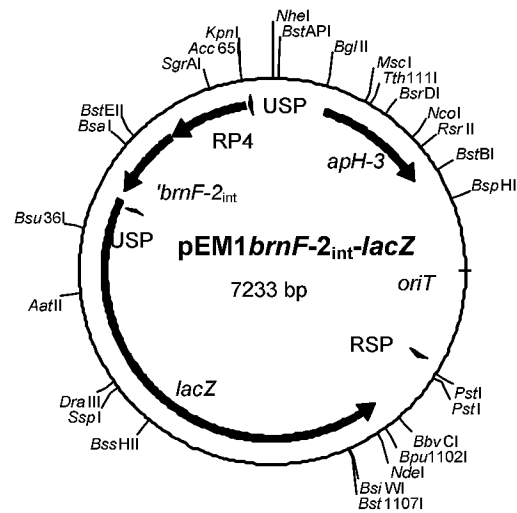


Abb. 40: pEM1*brnF*-2_{int}-*lacZ*: pEM1 mit einem internen 477 bp großen *brnF*-2 Fragment und einem 3,4 kb *lacZ*-Fragment aus piWiT10.

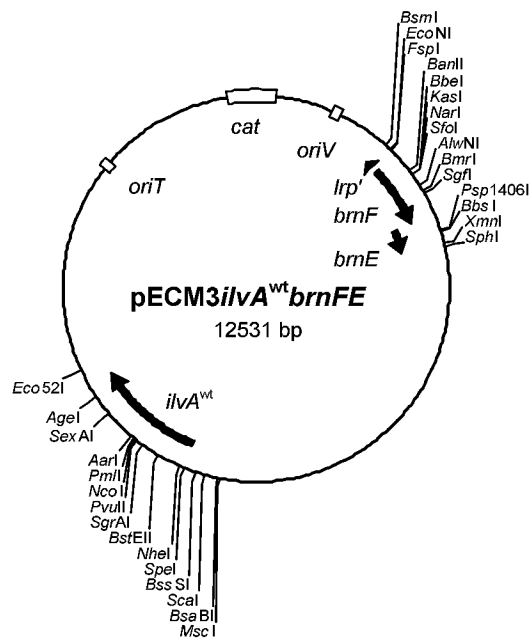


Abb. 41: pECM3*ilvA*^{wt}*brnFE*: pEM1*ilvA*^{wt} mit einem 1,3 kb *brnFE* Fragment.

3 Deletionsnachweise

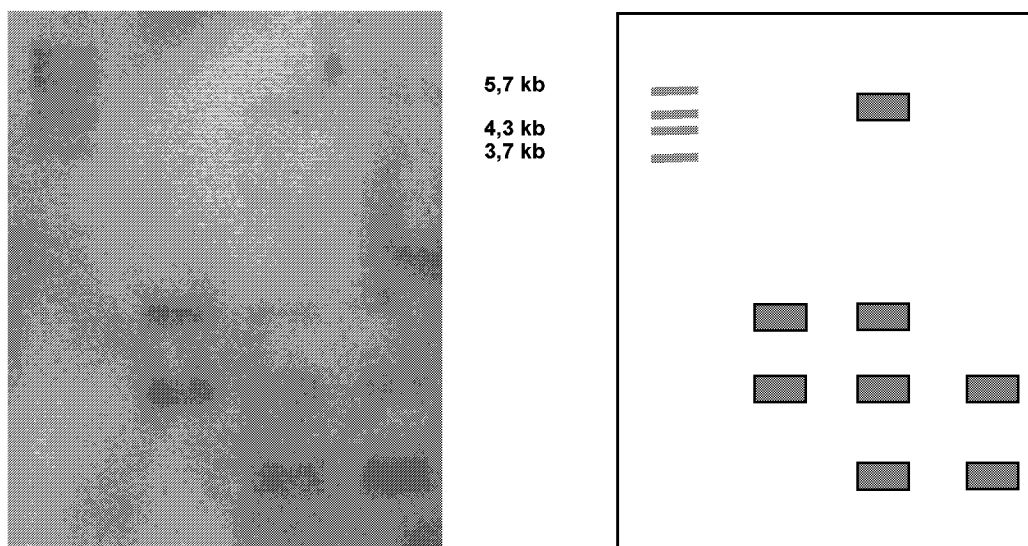


Abb. 42: Nachweis zur Deletion von *brnFE* in *C. glutamicum* 13032 mittels Southern Blot Analyse. Rechts sind die Fragmenten schematisch dargestellt. Die chromosomale DNA wurde mit *Avall* verdaut und folgende Fragmente erwartet:

Spur 1: λ -DNA *Bst*EII- verdaut, Digoxigenin-markiert

Spur 2: *C. glutamicum* 13032 Wildtyp: 1,4 und 1,0 kb;

Spur 3: 13032::pK19mobsacB Δ *brnFE*: 4,6 kb; 1,4 kb; 1,0 kb und 0,5 kb;

Spur 4: 13032 Δ *brnFE*: 1,0 und 0,5 kb.

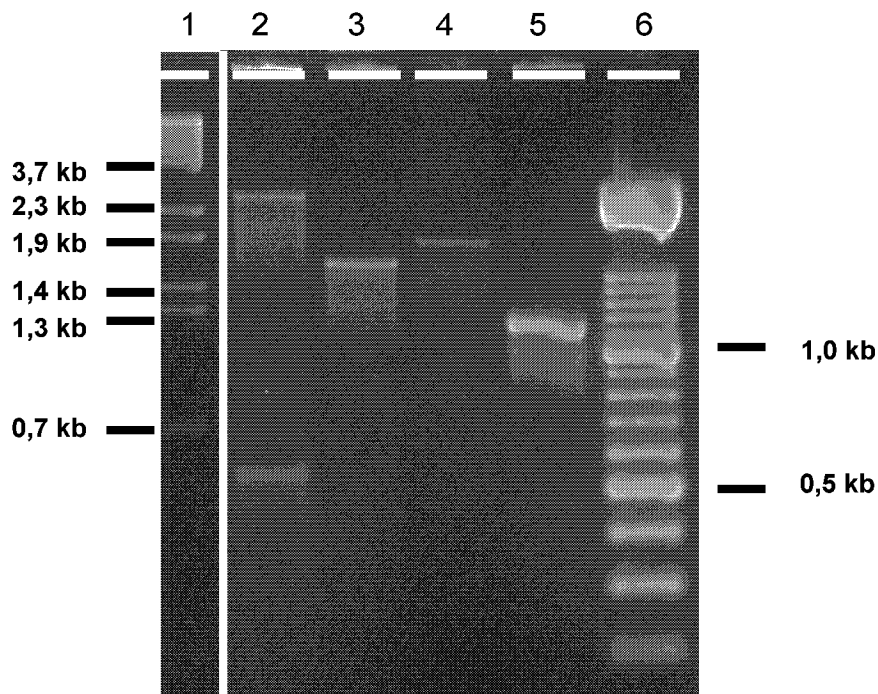


Abb. 43: PCR-Nachweis zur Deletion von *brnFE* und *brnF* in *C. glutamicum* 13032 oder MH20-22B. In Spur 2-4 sind die PCR's mit den Primern *Irp*-upper und delta-FE-Kontr zum Nachweis der *brnFE*-Deletion aufgetragen; bei Deletion entsteht ein 1,6 kb Fragment und im Wildtyp ein 2,5 kb Fragment. Spur 5-6 zeigen die PCR mit *Irp*-upper + *brnE*-lower zum Nachweis der Deletion von *brnF*; bei Deletion entsteht ein 1,2 kb und beim Wildtyp ein 1,8 kb Fragment.

Spur 1: λ -DNA *Bst*EII

Spur 2: PCR mit chromosomaler DNA von 13032

Spur 3: PCR mit chromosomaler DNA von 13032 Δ *brnFE*

Spur 4: PCR mit aufgekochten Zellen von MH20-22B Δ *lysA*

Spur 5: PCR mit aufgekochte Zellen von MH20-22B Δ *lysA* Δ *brnFE*

Spur 6: PCR mit chromosomaler DNA 13032

Spur 7: PCR mit aufgekochte Zellen 13032 Δ *brnF*

Spur 8: 100 bp Leiter

4 Datenblätter zur Produktbildung

Tab. 20: Datenblatt der Fermentation bei Amino GmbH mit MH20-22B Stämmen.

Schüttelkolbenversuch über 72h in CgXII-Medium

Bakterium: MH20-22B / pEK0hom^{Fbr} thrBC / pECM3ilvA^{wt} mit den Klonen JK1-JK3,
 MH20-22B / pEK0hom^{Fbr} thrBC / pECM3ilvA^{wt} brnFE mit den Klonen JK4-JK6,
 MH20-22BΔbrnQ / pEK0hom^{Fbr} thrBC / pECM3ilvA^{wt} brnFE mit den Klonen JK7-JK9,
 MH20-22BΔbrnQ / pEK0hom^{Fbr} thrBC / pECM3ilvA^{wt} mit den Klonen JK10-JK12,

Datum: 30.7.- 16.8.02

Kolben	Datum	Dauer	OD	pH-Wert	Glucose	Aminosäuren		
		[h]	[600 nm]		[g/L]	Ile [mM]	Lys [mM]	Leu [mM]
JK1 A OD(Vorkultur)= 6,3	30.7.02 14:40	0,0	0,8	7,49	38,7	n.n.	0,10	2,47
	31.7.02 14:15	23,6	1,4	8,08	37,2	0,39	0,21	2,15
	1.8.02 14:10	47,5	40,0	7,68	5,6	26,71	16,67	n.n.
	2.8.02 13:40	71,0	27,0	8,85	0,0	35,13	21,28	n.n.
JK1 B OD(Vorkultur)= 6,3	30.7.02 14:40	0,0	0,9	7,46	38,4	n.n.	0,11	2,31
	31.7.02 14:15	23,6	2,8	7,88	36,6	0,52	0,33	2,04
	1.8.02 14:10	47,5	35,0	7,27	2,1	24,89	12,05	n.n.
	2.8.02 13:40	71,0	28,0	8,54	0,1	27,03	13,16	n.n.
JK2 A OD(Vorkultur)= 6,7	30.7.02 14:40	0,0	0,9	7,46	38,4	n.n.	0,09	1,17
	31.7.02 14:15	23,6	6,6	7,82	32,1	2,58	0,20	1,75
	1.8.02 14:10	47,5	33,0	7,95	0,1	41,62	14,78	n.n.
	2.8.02 13:40	71,0	28,0	8,92	0,0	41,27	15,08	n.n.
JK2 B OD(Vorkultur)= 6,7	30.7.02 14:40	0,0	0,9	7,46	38,1	n.n.	0,08	2,38
	31.7.02 14:15	23,6	6,1	7,85	33,3	2,35	0,40	1,95
	1.8.02 14:10	47,5	38,0	8,17	0,0	40,90	13,35	n.n.
	2.8.02 13:40	71,0	25,0	8,81	0,2	41,81	13,96	n.n.
JK3 A OD(Vorkultur)= 5,9	30.7.02 14:40	0,0	0,7	7,46	39,5	n.n.	0,09	2,41
	31.7.02 14:15	23,6	2,0	8,18	36,5	0,62	0,07	1,39
	1.8.02 14:10	47,5	31,0	7,89	10,0	35,44	2,23	0,47
	2.8.02 13:40	71,0	25,0	8,87	0,0	52,47	3,58	0,18
JK3 B OD(Vorkultur)= 5,9	30.7.02 14:40	0,0	0,7	7,46	38,7	n.n.	0,07	1,95
	31.7.02 14:15	23,6	7,0	8,16	30,2	0,92	0,06	1,51
	1.8.02 14:10	47,5	33,0	7,96	10,5	34,52	2,17	0,47
	2.8.02 13:40	71,0	27,0	8,87	0,1	51,39	3,43	0,18
JK4 A OD(Vorkultur)= 2,1	6.8.02 11:35	0,0	1,0	7,34	39,0	n.n.	0,03	1,99
	7.8.02 11:25	23,8	46,0	7,76	8,4	23,40	11,91	0,02
	8.8.02 12:05	48,5	31,0	8,78	0,0	35,88	19,65	n.n.
	9.8.02 11:35	72,0	30,0	8,78	0,0	34,87	20,39	n.n.
JK4 B OD(Vorkultur)= 2,1	6.8.02 11:35	0,0	1,0	7,36	39,8	n.n.	0,03	2,11
	7.8.02 11:25	23,8	45,0	7,67	7,8	24,69	11,46	n.n.
	8.8.02 12:05	48,5	35,0	8,77	0,0	35,57	19,19	n.n.
	9.8.02 11:35	72,0	29,0	8,72	0,0	36,65	19,49	n.n.
JK5 A OD(Vorkultur)= 6,4	6.8.02 11:35	0,0	0,9	7,36	38,2	n.n.	n.n.	2,07
	7.8.02 11:25	23,8	9,3	7,89	32,5	2,6	1,2	1,40
	8.8.02 12:05	48,5	35,0	7,92	0,0	34,50	25,82	n.n.
	9.8.02 11:35	72,0	27,0	8,54	0,0	32,20	25,46	n.n.

Tab. 20 (ff): Datenblatt der Fermentation bei Amino GmbH mit MH20-22B Stämmen.

Kolben	Datum	Dauer	OD	pH-Wert	Glucose	Aminosäuren		
		[h]	[600 nm]		[g/L]	Ile [mM]	Lys [mM]	Leu [mM]
JK5 B OD(Vorkultur)= 6,4	6.8.02 11:35	0,0	0,9	7,36	38,8	n.n.	0,1	2,10
	7.8.02 11:25	23,8	9,4	7,91	31,4	2,9	1,2	1,44
	8.8.02 12:05	48,5	35,0	7,91	0,0	33,84	25,19	n.n.
	9.8.02 11:35	72,0	25,0	8,72	0,0	34,51	25,19	n.n.
JK6 A OD(Vorkultur)= 7,7	6.8.02 11:40	0,0	0,9	7,36	38,9	n.n.	0,1	2,10
	7.8.02 11:25	23,8	18,7	7,67	27,0	7,0	1,2	0,78
	8.8.02 12:05	48,4	35,0	8,38	0,0	37,48	18,36	n.n.
	9.8.02 11:35	71,9	21,0	8,79	0,2	36,88	18,14	n.n.
JK6 B OD(Vorkultur)= 7,8	6.8.02 11:40	0,0	1,0	7,37	39,3	n.n.	0,10	2,07
	7.8.02 11:25	23,8	19,5	7,67	25,8	7,79	1,58	0,74
	8.8.02 12:05	48,4	34,0	8,55	0,0	37,69	18,38	n.n.
	9.8.02 11:35	71,9	26,0	8,78	0,1	37,93	18,13	n.n.
JK7 A OD(Vorkultur)= 11,0	6.8.02 13:40	0,0	0,9	7,39	38,5	n.n.	0,03	2,02
	7.8.02 15:25	25,7	28,0	7,95	19,2	19,54	2,29	0,71
	8.8.02 13:55	48,2	34,0	8,47	0,3	46,74	6,20	0,14
	9.8.02 13:35	71,9	25,0	8,79	0,0	47,57	6,54	0,24
JK7 B OD(Vorkultur)= 11,0	6.8.02 13:40	0,0	0,9	7,38	38,8	n.n.	0,03	1,91
	7.8.02 15:25	25,7	27,0	8,07	20,5	18,41	1,89	0,76
	8.8.02 13:55	48,2	32,0	8,01	0,3	47,16	6,88	0,17
	9.8.02 13:35	71,9	26,0	8,84	0,0	48,15	7,25	0,27
JK8 A OD(Vorkultur)= 10,8	6.8.02 13:40	0,0	0,9	7,38	38,6	n.n.	0,04	2,00
	7.8.02 15:25	25,7	22,0	8,15	23,7	17,36	0,16	0,93
	8.8.02 13:55	48,2	37,0	8,29	0,0	54,37	1,98	0,30
	9.8.02 13:35	71,9	27,0	8,83	0,0	54,15	2,20	0,18
JK8 B OD(Vorkultur)= 10,8	6.8.02 13:40	0,0	0,9	7,33	38,1	n.n.	0,03	2,05
	7.8.02 15:25	25,7	25,0	8,05	18,8	21,25	0,54	0,79
	8.8.02 13:55	48,2	27,0	8,08	0,0	53,09	2,76	0,17
	9.8.02 13:35	71,9	26,0	8,72	0,0	55,20	2,35	0,27
JK9 A OD(Vorkultur)= 10,8	6.8.02 13:40	0,0	1,0	7,18	38,4	n.n.	0,03	2,14
	7.8.02 15:25	25,7	29,0	7,78	16,7	25,46	1,22	0,83
	8.8.02 13:55	48,2	32,0	8,43	0,0	53,81	2,12	0,15
	9.8.02 13:35	71,9	27,0	8,15	0,0	53,29	2,89	0,34
JK9 B OD(Vorkultur)= 10,8	6.8.02 13:40	0,0	1,0	7,17	37,8	n.n.	0,03	2,18
	7.8.02 15:25	25,7	31,0	7,83	17,6	24,54	1,17	0,82
	8.8.02 13:55	48,2	28,0	7,98	0,0	53,86	2,65	0,29
	9.8.02 13:35	71,9	23,0	8,12	0,1	52,11	2,58	0,33

Tab. 20 (ff): Datenblatt der Fermentation bei Amino GmbH mit MH20-22B Stämmen.

Kolben	Datum	Dauer	OD	pH-Wert	Glucose	Aminosäuren		
		[h]	[600 nm]			Ile [mM]	Lys [mM]	Leu [mM]
JK10 A OD(Vorkultur)= 5,6	13.8.02 11:20	0,0	0,9	7,15	38,9	n.n.	0,03	2,23
	14.8.02 11:45	24,4	32,0	7,72	20,4	20,95	1,00	0,88
	15.8.02 11:25	48,1	22,0	8,01	0,2	58,42	2,90	0,38
	16.8.02 11:15	71,9	19,9	8,08	0,0	56,56	2,21	0,34
JK10 B OD(Vorkultur)= 5,6	13.8.02 11:20	0,0	0,8	7,15	38,6	n.n.	0,03	2,19
	14.8.02 11:45	24,4	32,0	7,77	21,1	20,94	0,90	0,96
	15.8.02 11:25	48,1	23,0	8,12	0,0	60,13	2,76	0,39
	16.8.02 11:15	71,9	21,0	8,06	0,0	57,99	0,54	0,33
JK11 A OD(Vorkultur)= 8,8	13.8.02 11:20	0,0	0,9	7,14	39,1	n.n.	0,03	2,23
	14.8.02 11:45	24,4	37,0	7,57	16,1	28,51	1,15	0,83
	15.8.02 11:25	48,1	23,0	8,09	0,0	58,89	2,65	0,40
	16.8.02 11:15	71,9	17,4	8,01	0,0	57,30	2,82	0,38
JK11 B OD(Vorkultur)= 8,8	13.8.02 11:20	0,0	0,8	7,14	38,8	n.n.	0,03	2,24
	14.8.02 11:45	24,4	36,0	7,74	17,2	27,77	0,74	1,52
	15.8.02 11:25	48,1	25,0	8,12	0,1	59,35	2,53	0,38
	16.8.02 11:15	71,9	19,8	8,02	0,0	58,72	2,72	0,37
JK12 A OD(Vorkultur)= 5,8	13.8.02 11:20	0,0	0,9	7,13	38,9	n.n.	0,03	2,22
	14.8.02 11:45	24,4	33,0	7,74	17,0	28,21	1,19	0,87
	15.8.02 11:25	48,1	23,0	8,03	0,0	59,41	2,49	0,41
	16.8.02 11:15	71,9	20,0	7,99	0,0	58,99	2,70	0,39
JK12 B OD(Vorkultur)= 5,8	13.8.02 11:20	0,0	0,9	7,13	39,1	n.n.	0,03	2,23
	14.8.02 11:45	24,4	28,0	7,71	16,0	28,67	1,12	0,88
	15.8.02 11:25	48,1	26,0	8,13	0,0	60,11	2,46	0,42
	16.8.02 11:15	71,9	19,8	8,00	0,0	59,34	2,65	0,40

n.n. : nicht nachweisbar

Tab. 21: Datenblatt der Kultivierung von MH20-22B Stämmen im IBT-1.

Stamm	Zeit [h]	Mittelwert		Mittelwerte			Standardabweichung		
		OD	OD	Ile	Leu	Lys	Ile	Leu	Lys
		[600 nm]	s	mM	mM	mM	s	s	s
MH20-22B/ pEK0hom ^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA ^{wt}	0	0,4	0,0	0,0	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	14	4,6	1,5	2,3	3,5	0,0	0,4	0,5	0,0
	17	8,1	2,4	5,5	2,7	0,0	1,0	0,5	0,0
	20	13,4	3,5	10,5	1,7	1,1	1,4	0,5	1,6
	24	20,4	4,4	20,8	0,6	4,2	2,3	0,4	3,5
	28	25,6	4,1	39,9	0,0	9,1	3,0	0,0	5,0
	39	21,5	2,8	65,1	0,0	13,7	9,7	0,0	5,2
	48	22,0	1,4	70,8	0,0	15,5	7,6	0,0	7,0
MH20-22B/ pEK0hom ^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA ^{wt} brnFE	0	0,4	0,0	0,0	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	14	6,9	3,1	3,2	3,0	0,0	0,8	0,6	0,0
	17	12,1	3,9	7,6	2,0	0,0	2,0	0,7	0,0
	20	20,5	4,8	13,8	0,9	4,0	2,9	0,7	3,2
	24	27,1	4,6	27,1	0,0	9,3	3,3	0,0	5,6
	28	30,8	1,2	48,5	0,0	16,4	1,0	0,0	6,7
	39	22,5	1,0	74,2	0,0	25,0	6,0	0,0	9,8
	48	22,3	1,7	56,4	0,0	18,8	0,9	0,0	6,7
MH20-22BΔbrnQ/ pEK0hom ^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA ^{wt} brnFE	0	0,4	0,0	0,0	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	14	5,4	0,2	4,0	2,9	0,0	0,7	0,1	0,0
	17	8,2	0,3	9,5	2,6	0,0	1,3	0,2	0,0
	20	12,3	0,5	12,7	1,6	0,0	1,1	0,0	0,0
	24	16,9	1,4	25,9	0,9	0,7	0,5	0,1	0,5
	28	20,6	0,9	41,9	0,0	1,1	3,1	0,0	1,5
	39	21,7	1,6	83,7	0,0	4,6	9,4	0,0	0,7
	48	19,7	2,1	81,0	0,0	4,4	9,4	0,0	0,4
MH20-22B/ΔbrnQ pEK0hom ^{Fbr} thrBthrC pECM3ilvA ^{wt}	0	0,4	0,0	n.d.	3,9	0,0	n.d.	0,0	0,0
	14	4,6	0,3	3,6	3,3	0,0	0,5	0,1	0,0
	17	7,0	0,2	8,4	2,6	0,0	1,6	0,2	0,0
	20	10,6	0,3	12,5	1,6	0,0	1,1	0,2	0,0
	24	14,5	0,1	23,3	1,3	0,3	2,0	0,1	0,4
	28	18,7	0,6	35,9	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0
	39	25,1	1,8	76,5	0,0	4,5	3,0	0,0	0,6
	48	19,3	0,5	79,7	0,0	1,6	6,9	0,0	2,3

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biotechnologie 1 im Forschungszentrum Jülich angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Hermann Sahm möchte ich mich für die Überlassung des Themas, das Interesse und den konstruktiven Anregungen zur Arbeit bedanken.

Herrn PD Dr. Ralf Kölling-Paternoga danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. Lothar Eggeling bedanke ich mich ganz besonders für die ständige Diskussionsbereitschaft und die große Unterstützung.

Der Amino GmbH danke ich für die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen der Isoleucinproduktion.

Mirja Wessel danke ich für die Bereitstellung des Δlrp -Stammes, Steffen Schaffer für die Durchführung der MALDI-TOF Analysen und Axel Niebisch für die Erläuterungen zur nativen Proteinaufreinigung.

Karin Krumbach und Petra Simic danke ich für die gute Hilfestellung in technischen Fragen und ständige Diskussionsbereitschaft.

Unserer Arbeitsgruppe mit Yvonne Tilg, Eva Krings, Eva Radmacher, Thomas Junold, Petra Peters-Wendisch, Roman Netzer, Helga Etterich, Michael Stolz Corinna Stansen, Prof. Tadao Oikawa und So-Sun Chung danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor, die gute Zusammenarbeit und die nette Freizeitgestaltung.

Eva Radmacher, Kerstin Morjan, Marc Wingens und Jan Marienhagen danke ich für ihre engagierte Arbeit im Rahmen ihrer Praktika.

Mirja, Axel und Martina danke ich für die angenehme Büroatmosphäre, trotz ab und zu mal dicker Luft.

Bei Christina, Olli K., Andrea, Tino, Christian, Georg, Volker, Takeru, Tanja, Axel, Mirja, Maren, Daniel, Thomas, Ulli und allen anderen bedanke ich mich nicht nur für die angenehme Atmosphäre im Institut, sondern auch das Bierchen am Abend.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Michael, für die große Unterstützung und ständige Ermutigung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4054
April 2003
ISSN 0944-2952